



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

IRACEMA DE AZEVEDO MONTE PAIVA

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO ISOLADOS DE *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.**

**CAMPINA GRANDE – PB
2023**

IRACEMA DE AZEVEDO MONTE PAIVA

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO ISOLADOS DE *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de Concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal

Orientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

CAMPINA GRANDE-PB

2023

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P149d Paiva, Iracema de Azevedo Monte.
Diversidade de rizóbios nativos de solos do semiárido pernambucano isolados de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. [manuscrito] / Iracema de Azevedo Monte Paiva. - 2023.
77 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, Departamento de Biologia - CCBS. "

1. Tamboril. 2. Rizóbios. 3. Fixação biológica de nitrogênio.
4. Gene 16S rRNA. I. Título

21. ed. CDD 581.7

IRACEMA DE AZEVEDO MONTE PAIVA

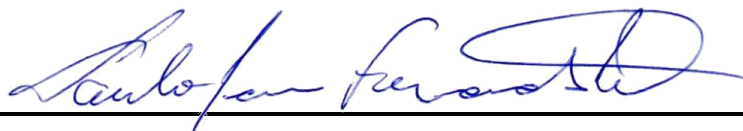
**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO
PERNAMBUCANO ISOLADOS DE *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.)
Morong.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

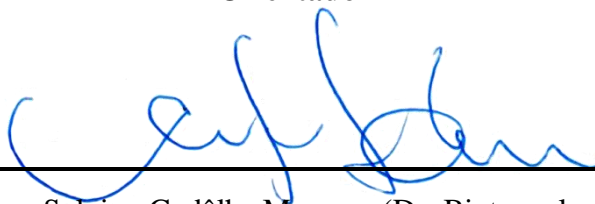
Área de Concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal

APROVADO EM: 14.04.2023

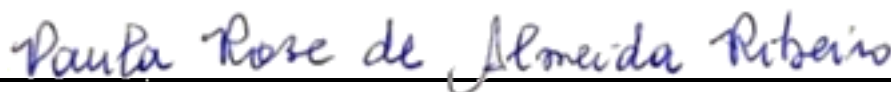
BANCA EXAMINADORA



Paulo Ivan Fernandes Júnior (Dr. Ciência do solo) – EMBRAPA Semiárido
Orientador



Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (Dr. Biotecnologia vegetal) – UEPB
Examinador I



Paula Rose de Almeida Ribeiro (Dra. Microbiologia Agrícola) – EMBRAPA
Semiárido
Examinador II

A minhas irmãs, Açucena Paiva e
Tainá Mel

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida, por sempre estar ao meu lado segurando minha mão e pelas bênçãos derramadas constantemente em minha vida e na vida dos meus.

A minha família, em especial, Mainha, painho, Açucena, Mel, mãeulhe e vó Rita, por serem porto seguro e meu motivo para nunca desistir. Minha gratidão é muito pequena quando comparado ao meu amor por vocês.

A meu namorado, Heitor Carvalho, obrigada pelo apoio, cumplicidade e incentivo. Ter você comigo nesse período foi essencial, te amo!

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos membros da banca examinadora, obrigada pela participação e pelas contribuições.

Agradeço aos profissionais da EMBRAPA Semiárido pelos conhecimentos compartilhados. O agradecimento é extensivo a esta empresa brasileira de excelência em pesquisa pela cessão irrestrita da estrutura física, equipamentos, transporte e materiais para a execução desse trabalho. Fazer pesquisa nesse lugar me fez ter mais certeza da fundamental importância da pesquisa científica para o desenvolvimento do campo e seus desdobramentos para a sociedade, esse é o caminho.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo, pela confiança, disponibilidade e, sem dúvidas, pela paciência. Agradeço também por me apresentar o mundo das BFN e por todo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do LMS, Jonathan, Geovanne, Raíra, Valéria Alves, Joan, Marcelo, Anderson, Naiara e Sheiça, agradeço pela acolhida, rotina e amizade. Guardarei cada aprendizado e momento vivido de forma única. Sem vocês, não teria sido tão especial.

Em especial, agradeço a técnica Viviane Siqueira, minha Vivi-Anny. Gratidão por sua amizade, conselhos, ensinamentos cotidianos, parceira da vida fit – às vezes, e, principalmente, por ter me apresentado com uma família pernambucana, peço que Deus abençoe sempre vocês. Mais uma vez: Muito obrigada por tudo!

A bolsista de pós-doutorado, Dra Paula Rose, por toda paciência, amizade, parceria de almoço, pelos ensinamentos científicos e de vida e por todas as contribuições nesta pesquisa. Paula é um exemplo pra mim. Muito obrigada.

Aos amigos que conquistei durante esse período, Hallana, Dayse, Wedson, Ana Paula, Júlia, aos amigos de longas datas Phamella, Bárbara, Khyson, Aline, Roanna, Maylla e Emilly. E em especial, ao meu primo Jesley Bandeira, por todo apoio e disponibilidade.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa realização profissional e pessoal, muito obrigada.

RESUMO

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong., conhecida como tamboril ou orelha de macaco, é uma leguminosa nativa do Brasil que ocorre do norte ao sul do país. Apresenta característica rústica e adaptabilidade para as condições edafoclimáticas do Semiárido brasileiro. Tamboril é uma espécie promissora para a recuperação de áreas degradadas, e estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN). As BFN nodulíferas em leguminosas são popularmente conhecidas como rizóbios, no qual, são responsáveis por até 100% da fixação biológica de nitrogênio. A busca pela seleção de rizóbios eficientes, para a produção de inoculantes, surge como uma alternativa econômica, ecológica e sustentável, por causa dos impactos ambientais e dos altos custos no uso de fertilizantes nitrogenados. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*, oriundos de solos do Semiárido pernambucano. Foram coletados solos em cinco municípios de Pernambuco: Betânia, Parnamirim, Santa Cruz, Santa Maria da Boa Vista e Serra Talhada. Para a captura dos isolados, foi montado um experimento, em condições de viveiro, utilizando tamboril como planta-isca. Após 95 dias de condução do experimento os nódulos foram coletados e realizado a desinfestação superficial. Para a obtenção de culturas puras, foram realizadas sucessivas repicagens em placas de Petri com meio YMA. Os isolados obtidos foram caracterizados geneticamente por meio das análises de amplificação de fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* pela técnica de Duplex-PCR, as técnicas de BOX-PCR e ARDRA e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foi obtida uma coleção com 207 isolados bacterianos, a partir da análise de 127 nódulos. O solo oriundo do município de Betânia apresentou a maior quantidade de isolados (56), seguido por Parnamirim (55), Serra Talhada (43 isolados), Santa Cruz (31) e Santa Maria da Boa Vista (22). Na análise da variabilidade genética por BOX-PCR, os isolados de tamboril apresentaram perfis de bandas diversos, demonstrando alta diversidade genética. Os 32 isolados que foram selecionados para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foram identificados nos seguintes gêneros: *Rhizobium* (17), *Agrobacterium* (3), *Bradyrhizobium* (2), e *Paraburkholderia* (1), também foram identificados isolados não-rizobianos, pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas* (2), *Brucella* (2), *Labrys* (2), *Pleomorphomonas* (1), *Bacillus* (1), e *Siphonobacter* (1). Esses resultados demonstram que os rizóbios isolados de nódulos radiculares de tamboril, de solos de diferentes localidades do Semiárido pernambucano, pertencem a alfa (*Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium*) e beta-rizóbios (*Paraburkholderia*). Porém, ocorre predomínio de bactérias pertencentes ao gênero

Rhizobium, principalmente relacionadas a espécie *R. dioscoreae* S-93^T (99,09 - 100% de similaridade).

Palavras-chave: região Semiárida brasileira; tamboril; fixação biológica de nitrogênio; gene 16S rRNA; *Rhizobium*.

ABSTRACT

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong., known as monkfish or monkey, is a legume native to Brazil that occurs from the north to the south of the country. It has a rustic character and adaptability to the edaphoclimatic conditions of the Brazilian semiarid region. Monkfish is a promising species for recovering degraded areas and establishing symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. Noduliferous bacteria in legumes are popularly known as rhizobia, in which they are responsible for up to 100% of biological nitrogen fixation. The search for the selection of efficient rhizobia for the production of inoculants appears as an economic, ecological, and sustainable alternative because of the environmental impacts and the high costs of using nitrogen fertilizers. This work aimed to evaluate the genetic diversity of rhizobia isolated from *Enterolobium contortisiliquum* nodules from soils in the semiarid region of Pernambuco State. Soils were collected in five municipalities of Pernambuco State: Betânia, Parnamirim, Santa Cruz, Santa Maria da Boa Vista, and Serra Talhada. An experiment was set up under nursery conditions to capture the isolates, using monkfish as a trap plant. After 95 days of experimenting, the nodules were collected, and a superficial disinfection was carried out. The material was spread in streaks to obtain single colonies in Petri dishes with YMA medium. The isolates obtained were genetically characterized by analysis of fragment amplification of the symbiotic genes *nifH* and *nodC* using the Duplex-PCR, BOX-PCR, ARDRA and partial sequencing of the 16S rRNA gene. A collection of 207 bacteria was obtained from analyzing 127 nodules. Soil from the municipality of Betânia had the highest number of isolates (56), followed by Parnamirim (55), Serra Talhada (43 isolados), Santa Cruz (31) and Santa Maria da Boa Vista (22). In the analysis of genetic variability by BOX-PCR, the monkfish isolates showed different band profiles, demonstrating high genetic diversity. The 32 isolates that were selected for partial sequencing of the 16S rRNA gene were identified in the following genera: *Rhizobium* (17), *Agrobacterium* (3), *Bradyrhizobium* (2), and *Paraburkholderia* (1). Non-rhizobial isolates belonging to the genera: *Pseudomonas* (2), *Brucella* (2), *Labrys* (2), *Pleomorphomonas* (1), *Bacillus* (1), and *Siphonobacter* (1) were also identified. These results demonstrate that rhizobia isolated from monkfish root nodules from soils in different semiarid regions of Pernambuco State belong to alpha (*Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium*) and beta-rhizobia (*Paraburkholderia*). However, there is a predominance of bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, mainly related to the species *R. dioscoreae* S-93T (99.09 - 100% similarity).

Keywords: brazilian semiarid region; monkfish; biological nitrogen fixation; 16S rRNA gene; *Rhizobium*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem, classificação do solo, precipitação, temperatura anual e descrição da longitude, latitude e elevação dos locais de coleta dos solos	32
Tabela 2. Caracterização química das amostras de solo de cinco municípios no estado de Pernambuco.....	34
Tabela 3. Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 32 bactérias isoladas de nódulos radiculares de tamboril (<i>Enterolobium contortisiliquum</i>), oriundas de diferentes solos do estado de Pernambuco.....	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Experimento para para captura dos isolados utilizando *Enterolobium contortisiliquum* como planta-isca. A) Sementes de *Enterolobium contortisiliquum*. B) Vasos de 0,5 L com as sementes plantadas nos diferentes solos de Pernambuco. C) Início da germinação das sementes. D) Desbaste das mudas.....35
- Figura 2.** Amplificação dos genes simbióticos nifH e nodC na reação de Duplex- PCR de isolados de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* oriundos de diferentes solos do Semiáridopernambucano.....42
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade baseado na análise de *fingerprinting* por BOX-PCR de 93 isolados de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente Dice.....43
- Figura 4.** Árvore filogenética feita pelo ARDRA utilizando três enzimas AluI, HhaI e HaeIII obtida pelo programa BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica).....45
- Figura 5.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene 16S rRNA de 23 estirpes de rizóbios, isoladas de nódulos radiculares de *Enterolobium contortisiliquum* e 48 estirpes tipo de *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* (1291 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso no GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética....47

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

μM: micromolar

ADE: Água destilada estéril

bp: Pares de base

CFB: Cytophaga, Fusobacterium e Bacteróides

Cm: Centímetro

DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado

DNA: Ácido desoxirribonucleico **FBN:** Fixação biológica de nitrogênio **Km²:** Quilômetros quadrado

LMS: Laboratório de microbiologia do solo

m: metro

mL: Mililitro **mm:** Milímetro **N:** Nitrogênio **NH₃:** Amônia **P:** Fósforo

PE: Pernambuco

RPM: Rotação por minuto

V: Volts

YMA: Yeast Manitol Agar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	Caracterização e diversidade do Semiárido brasileiro.....	17
3.2	Família <i>Fabaceae</i> e sua importância no Semiárido brasileiro.....	19
3.2.1	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong.....	20
3.3	Fixação biológica de nitrogênio.....	23
3.4	Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas arbóreas no Semiárido.....	28
3.5	Técnicas de biologia molecular para analisar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Solo: Origem, coleta e análise.....	32
4.2	Experimento para captura dos isolados utilizando <i>Enterolobium contortisiliquum</i> como planta-isca.....	35
4.3	Isolamento, purificação e estoque dos isolados.....	36
4.4	Análises moleculares.....	37
4.4.1	Extração de DNA das estirpes bacterianas.....	37
4.4.2	Duplex-PCR: Amplificação simultânea dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	37
4.4.3	BOX-PCR dos isolados.....	38
4.4.4	Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) dos isolados.....	39
4.4.5	Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise filogenética.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Avaliação da nodulação e isolamento de bactérias dos nódulos de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> - experimento de planta-isca.....	41
5.2	Seleção dos isolados por meio do Duplex-PCR.....	41
5.3	Fingerprinting molecular por BOX-PCR dos isolados de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	42
5.4	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).....	44
5.5	Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	46
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro é conhecido por ter um bioma exclusivamente brasileiro, a Caatinga, rico em biodiversidade com a presença de uma fauna e flora únicas. Mas, com o passar dos anos, a pressão antrópica, através do crescimento populacional, construção civil e atividades agropecuárias intensivas, resultou na degradação desse bioma, surgindo assim a necessidade de se elaborarem ações para sua recuperação, incluindo os estudos com as espécies arbóreas que apresentam potencial para uso em projetos de recuperação de áreas degradadas.

A família *Fabaceae*, presente na Caatinga, representa a maior parte da diversidade florística da região Nordeste do Brasil, com espécies que apresentam características de adaptabilidades às condições edafoclimáticas do Semiárido (BFG, 2015; ZAPPI et al., 2015). Estudos têm evidenciado que a seleção de espécies adaptadas às condições locais pode contribuir para o aumento da sobrevivência em campo e a aceleração do processo de recomposição (COSTA et al., 2002; CARVALHO et al., 2022).

Dentre as espécies dessa família, o tamboril - *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong., é uma árvore de origem brasileira que ocorre do norte ao sul do país (ARAÚJO; PAIVA SOBRINHO, 2011). Essa espécie possui alta capacidade de brotação após a mortalidade do caule, tolera variações climáticas e solos pobres em nutrientes, sendo considerada uma espécie ideal em projetos de recuperação de áreas degradadas (FERNANDES et al., 2017; SILVA et al., 2021). Além disso, *E. contortisiliquum*, destaca-se pela sua capacidade em estabelecer simbiose eficiente com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) (MOREIRA et al., 2010; SOUSA et al., 2013; JESUS et al., 2014). Entretanto, na literatura há poucos estudos sobre rizóbios em simbiose com *E. contortisiliquum* (MARTÍNEZ ALCÁNTARA et al., 2020).

Incluídas em um grupo de microrganismos de grande importância para os ecossistemas, as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) são responsáveis pela principal entrada de nitrogênio (N) nas cadeias alimentares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As BFN nodulíferas em leguminosas são amplamente conhecidas como rizóbios. Essas bactérias são capazes de induzir nódulos nas raízes de plantas leguminosas, onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio, e podem fornecer até 100% do N necessário para o desenvolvimento das culturas (EMBRAPA, 2019).

A utilização de rizóbios em programas de recuperação de áreas degradadas, representa uma alternativa viável para redução de custos e sustentabilidade ambiental (CUNHA et al.,

2016). Com isso, pesquisas para seleção de rizóbios eficientes e competitivos com as estirpes nativas, tornam-se necessárias para os programas de recuperação de áreas degradadas como também para o desenvolvimento sustentável da produção agrícola (BIDLACK; RAO; DEMEZAS, 2001; RUFINI et al., 2014; FERNANDES e QUEIROZ, 2018).

A estirpe *Bradyrhizobium* sp. (BR 4406), foi aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para utilização como inoculante para a espécie *E. contortisiliquum* (BRASIL, 2011). Entretanto, estudos desenvolvidos com essa estirpe, têm apresentado baixa eficiência da inoculação em mudas de *E. contortisiliquum* (SOUSA et al., 2013; JESUS et al., 2014). O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* oriundos de solos do Semiárido pernambucano.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong., oriundos de solos do Semiárido pernambucano.

2.2 Específicos

- Isolar rizóbios de nódulos radiculares de *Enterolobium contortisiliquum*;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados bacterianos por meio das análises moleculares: Duplex-PCR, BOX-PCR, Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) e o Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Estruturar uma coleção de rizóbios associados a *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong., oriundas de diferentes solos do Semiárido pernambucano.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caracterização e diversidade do Semiárido brasileiro

O Semiárido brasileiro é o mais extenso da América do Sul, ocupando uma área de 980.000 km² (KIILL et al., 2013; GUSMÃO et al., 2016). A região é formada por 1.135 municípios distribuídos por nove estados, incluindo Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e parte do norte de Minas Gerais (CASTRO; CAVALCANTE, 2011; SIQUEIRA FILHO, 2012; ARAÚJO FILHO, 2013).

No território do Semiárido brasileiro, a ocorrência de chuvas é inconstante e se dá entre os meses de janeiro e maio, com volume de chuvas oscilando entre 250 a 800 mm/ano (MAIA, 2012). Essa variação, resulta em alterações constantes no balanço hídrico. Além disso, quando os níveis de temperatura são elevados a evaporação aumenta e faz com que o solo retenha menos umidade, mesmo que os índices pluviométricos permaneçam constantes (CGEE, 2016).

Em contrapartida, o Semiárido brasileiro é considerado um dos que dispõem de maior precipitação pluviométrica a nível mundial, sendo muito diverso em fauna, flora e ambientes (LIMA et al., 2016). A maior parte do seu território é ocupado pelo bioma exclusivamente brasileiro, a Caatinga, onde grande parte das espécies vegetais e animais são endêmicas (VOLTOLINI et al., 2019).

A primeira definição científica da Caatinga foi dada em 1840: “*Sylva aestu aphylla*”, na qual foi destacado as suas principais características: vegetação arborecente lenhosa (*sylva*) e perda total das folhas (*aphylla*) durante a estação seca (*aestu*) (MARTIUS, 1996). O termo “Caatinga” é de origem Tupi-Guarani e tradicionalmente interpretado como Caa = mata e tinga = branca, em virtude da aparência da vegetação na estação seca, após a queda das folhas, deixando os seus troncos esbranquiçados (PRADO, 2003).

A vegetação presente no bioma Caatinga é caracterizada por apresentar uma ampla variedade de fisionomia, podendo variar de plantas herbáceas até árvores de grande porte. Essa pluralidade está relacionada as condições ambientais em que a vegetação está inserida, como o regime de chuvas, temperatura, luminosidade, tipo de solo, dentre outros (SERAFIM FILHO, 2014). Várias nomenclaturas são adotadas para se referir à Caatinga, como: Agreste, Sertão, Cariri, Seridó e Carrasco (ARAÚJO FILHO, 2013).

O bioma Caatinga apresenta dominância de formações xerófilas, que são plantas que

dispõem de formas adaptativas marcantes associadas ao estresse hídrico e às altas temperaturas (VOLTOLINI et al., 2019). Uma característica predominante das espécies vegetais desse bioma, é a queda de folhas na estação seca, o que diminui a perda de água pelo processo de transpiração.

Outras características que podem ser observadas é a presença do bom desenvolvimento do sistema radicular, o qual facilita a captação de água no solo e a adaptação das folhas em forma de espinhos ou acúleos (LEAL et al., 2003; DE SOUSA; SOBRINHO, 2016).

Apesar de possuir essa grande riqueza em flora e fauna, a Caatinga brasileira vem apresentando uma constante degradação da sua biodiversidade, sendo considerado o terceiro bioma mais degradado do país (MAPBIOMAS, 2022). De acordo com as pesquisas do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), em seu Programa de Monitoramento do Desmatamento por Satélite (PRODES), no período de 2000 a 2016 o bioma Caatinga apresentou um desmatamento acumulado de 354.354 km², o que corresponde a 41,09% da sua área total. Nos anos de 2017 a 2021 houve um acréscimo de 13.262 km², o que totaliza 42,63% de área total degradada (INPE, 2022).

Esses resultados estão associados, em parte, ao processo de degradação e alteração da cobertura florestal pelo emprego de atividades antrópicas inadequadas (REFATI et al., 2020), colocando em risco o funcionamento do ecossistema. Na perspectiva da preservação, foi instituído o Código Florestal, Lei 12.651/2012, no qual estabelece que todo imóvel rural situado no bioma Caatinga deve preservar 20% da sua vegetação nativa. Entretanto, mesmo com a implantação da Lei, o crescimento das áreas agrícolas nesses biomas não para (MARTINS e RANIERI, 2014).

Dentre as atividades antrópicas que causam degradação do bioma Caatinga e consequente perda de biodiversidade, tem-se o desmatamento, uma prática frequente em que a vegetação nativa é derrubada para servir de energia para indústrias, como cerâmicas, olarias e gesso (ALTHOFF et al., 2018; REFATI et al., 2020). As áreas desmatadas também dão espaço ao plantio e à pecuária, muitas vezes de maneira inadequada, com o uso intensivo de adubos químicos, manejo impróprio da irrigação e adoção de pecuária extensiva, fazendo uso da terra acima da sua capacidade de suporte (ALTHOFF et al., 2018). Como consequência, essas atividades contribuem para a perda de fertilidade dos solos, salinização e desertificação dos solos do bioma e a sua fauna e flora (CASTRO; SANTOS, 2020).

Embora a Caatinga seja reconhecida como um dos biomas brasileiros mais ameaçados, poucos esforços são desenvolvidos para a sua conservação. Tendo em vista a sua importância

e o seu elevado número de espécies endêmicas, é indispensável a preservação e conservação dessa área, com a adoção de iniciativas dedicadas ao desenvolvimento sustentável do bioma (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

3.2 Família *Fabaceae* e sua importância no Semiárido brasileiro

O bioma Caatinga é reconhecido por sua diversidade em sua flora, representada por, no mínimo, 962 gêneros, 153 famílias e 3.347 espécies (FERNANDES et al., 2020). Dentre as famílias presentes nesse bioma, a *Fabaceae*, também denominada *Leguminosae* é um importante grupo taxonômico botânico, considerado o de maior representatividade no Brasil, com 2.807 espécies distribuídas em quase todos os biomas do país (LIMA et al., 2013). Além disso, é uma das maiores famílias em termos de diversidade florística da Caatinga, com 617 espécies registradas (ZAPPI et al., 2015).

A família *Fabaceae* é dividida em três subfamílias: *Papilionoideae* (*Faboideae*), *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* e possui uma distribuição cosmopolita com espécies herbáceas, arbustivas, arbóreas e lianas (RODRIGUES; MACHADO, 2006). A *Papilionoideae* é, dentre elas, a maior subfamília, ocorrendo nodulação com a maioria dos gêneros (SPRENT; PARSONS, 2000).

A *Mimosoideae* é a segunda maior subfamília da *Fabaceae*, compreende quatro tribos (*Mimoseae*, *Mimozygantheae*, *Acacieae* e *Ingeae*), mundialmente representada por cerca de 3.270 espécies e 82 gêneros (LEWIS et al. 2005), sendo a maioria arbóreas tropicais, subtropicais e temperadas. No Brasil, está representada por aproximadamente 824 espécies e 37 gêneros (LIMA et al., 2014). E a subfamília *Caesalpinioideae* é considerada a mais primitiva e a primeira a evoluir (HERENDEEN, 1992; SPRENT e PARSONS, 2000). Essa subfamília tem menos membros nodulares, compreendendo aproximadamente 25% dos membros desse grupo (LEWIS et al., 2005).

Por apresentar grande diversidade morfológica, as espécies pertencentes à família *Fabaceae* também são reconhecidas por apresentar diferentes formas de uso pela população brasileira. Destaca-se o uso para alimentação humana e animal, na medicina popular, produtos aromáticos, produção de forragem, como adubação verde, plantas de cobertura, celulose e papel, carvão, cercas vivas, sistemas agroflorestais, na construção civil e em rituais religiosos (SAMPAIO et al., 2005; ZAPPI et al., 2015).

As plantas pertencentes à família *Fabaceae* também são empregadas em projetos de recuperação de áreas degradadas em todo o mundo (DA SILVA et al., 2016). Algumas plantas

desta família apresentam fatores que as tornam fundamentais para essa finalidade, como o fácil estabelecimento no campo, sistema radicular profundo, crescimento rápido, elevada produção de biomassa, altos teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) na biomassa, biomassa de fácil decomposição, tolerância às condições adversas de solo e clima, e principalmente capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios (DRUMOND et al., 2004; COSTA e DURIGAN, 2010; CHAER et al., 2011).

A relação simbiótica entre leguminosas e rizóbios é uma atividade significativa para a produção agrícola e sistemas naturais, por exemplo nos plantios de frutíferas, onde espécies leguminosas são usadas para suprir a demanda de nitrogênio (PAULA et al., 2018; SILVA et al., 2020). De acordo com Espindola et al. (2006), o uso das leguminosas que apresentam elevado potencial de fixação biológica de nitrogênio e de produção de biomassa, como adubos verdes, proporciona economia na produção com fertilizantes químicos e contribui para o manejo ecológico da produção.

Essa associação é benéfica para ambas. Para as plantas é fornecida uma maior quantidade de nitrogênio, enquanto que as bactérias são beneficiadas com compostos que servirão como fontes de energia para o seu desenvolvimento. Apesar dos benefícios dessa associação, as leguminosas variam entre altamente específicas ou altamente promíscuas, podendo estabelecer simbiose com apenas uma espécie de bactéria ou com diferentes gêneros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

3.2.1 *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong., é uma árvore nativa do Brasil que está presente nos biomas Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. A sua ocorrência já foi confirmada na região Nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, e Rio Grande do Norte), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, e São Paulo), e no Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (MORIM et al., 2020). A presença dessa espécie também já foi confirmada em outros países da América do Sul, como Colômbia, Peru, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Argentina (MILNITSKY et al., 1997; BACKES e IRGANG, 2009; MARTÍNEZ ALCÁNTARA et al., 2020).

Enterolobium contortisiliquum é conhecida popularmente como tamboril, orelha-de-macaco, orelha-de-negro, timbaúba, timbó, tambaré, timbaúva, ximbó e pacará (LORENZI, 2002; LEAL et al., 2017; MORIM et al., 2020), pertence à família *Fabaceae*, subfamília

Mimosoideae, e está incluída na série de clímax do grupo sucessional que demanda de luz (OLIVEIRA-FILHO et al., 1995). A espécie é classificada como caducifolia, heliófila, de rápido crescimento, podendo atingir cerca de 30 m de altura e 1,60 m de diâmetro. É pouco comum em florestas primárias, concentra-se majoritariamente em solos úmidos e é encontrada com mais frequência em capoeiras com estágios mais avançados de sucessão secundária (CORREIA, 1984; LORENZI, 2016).

Os frutos dessa espécie são lisos, brilhantes, indeiscentes e marrom-escuros, enquanto as sementes são duras, ovais e marrons (BARRETTO e FERREIRA, 2011). A produção de vagens começa em maio, amadurecem e caem entre agosto e novembro, durante a estação seca (LORENZI, 2008). As sementes de *E. contortisiliquum* possuem propriedades medicinais, sendo identificadas como inibidoras de proteinases de origem vegetal eficazes contra ascélulas do câncer gástrico (PAULA et al., 2012).

Além disso, *E. contortisiliquum* é descrito como uma leguminosa com ampla utilidade (LORENZI, 2008). Adequada para o paisagismo em grandes espaços, utilização como forragem, apicultura, produção de lenha, fabricação de brinquedos, laminados, compensados, artesanato e telhados (BACKES e IRGANG, 2009; DE MUÑIZ e MARCHIORI, 2009; LORENZI, 2016). No Brasil, estudos evidenciam a importância socioambiental de *Enterolobium contortisiliquum* (MOREIRA et al., 1998; MIGUEL e MOREIRA., 2001; FERREIRA et al., 2012; JESUS et al., 2014; SILVA et al., 2021).

Uma característica marcante de *E. contortisiliquum* é a sua capacidade de rápida regeneração, o que a torna muito utilizada na recuperação de áreas degradadas com solos pobres de preservação permanente em plantios mistos (LEITE et al., 2017). O sucesso do estabelecimento inicial dessa árvore está relacionado à captura e ao uso de recursos primários, como luz e nutrientes (SÃO PAULO, 2011).

Estudos relataram que o sistema radicular dessa planta é caracterizado por sua profundidade e por apresentar tolerância ao excesso de metais pesados em um solo contaminado por mineração de ouro, acidez do solo e estresse de temperatura (FRANCO et al., 1992; RANGEL et al., 2014). Além disso, Silva et al. (2011) verificaram que o *E. contortisiliquum* possui tendência de armazenar o cobre nas raízes e não o transportar para a parte aérea, o que resulta em baixas doses de cobre no solo.

Em um estudo conduzido por Fauerharmel (2014), em Santa Maria-RS, mudas de *E. contortisiliquum* foram submetidas a diferentes substratos e lâminas de irrigação. Todas as mudas apresentaram 100% de sobrevivência. Os resultados demonstram que *E. contortisiliquum* apresenta potencial de uso em projetos de recuperação de áreas degradadas,

principalmente por ser resistente a áreas com solos degradados e déficit hídrico, além de ter uma alta capacidade de brotação após a mortalidade do caule.

Silva et al. (2021) avaliaram o crescimento em altura, diâmetro e taxa de sobrevivência de mudas de *E. contortisiliquum* e *Mimosa caesalpiniiifolia* inoculadas com *Azospirillum brasilense* e sem inoculação, em área degradada de mineração no município de Itaporanga d'Ajuda (SE). Esses autores observaram que *E. contortisiliquum* obteve uma alta sobrevivência das mudas, sendo recomendada para recuperação de áreas degradadas por mineração.

Além de ser utilizada na recuperação de áreas degradadas, *E. contortisiliquum* é uma espécie promissora para utilização na arborização urbana, a consolidação de encostas dos rios e habitat para a fauna silvestre (MARTINS, 2009). Além disso, *E. contortisiliquum* é conhecida por estabelecer simbiose eficiente com bactérias fixadoras de nitrogênio (MOREIRA et al., 2010; SOUSA et al., 2013; e JESUS et al., 2014).

Em solos tropicais, essencialmente no Brasil, pesquisas identificaram que o gênero *Paraburkholderia*, é comumente encontrado em nódulos de espécies de alguns membros da subfamília *Mimosoideae* (*Mimosa* spp.), na qual está inserida *E. contortisiliquum* (BONTEMPS et al., 2010; BOURNAUD et al., 2013; DIAS et al., 2021; SOARES NETO et al., 2022).

Outras pesquisas demonstraram a capacidade de espécies de leguminosas arbóreas de associarem-se com rizóbios nativos do Semiárido brasileiro, incluindo sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) nodulada por *Burkholderia*, leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) (DOS REIS JUNIOR et al., 2010; DA SILVA et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; MENEZES et al., 2017; DIAS et al., 2021). Contudo, pouco ainda se sabe sobre as características, diversidade e eficiência de seus microssimbiontes.

Patreze e Cordeiro (2005), examinando os efeitos da inoculação com rizóbio e micorrizae da fertilização com nitrogênio e fósforo (P) no crescimento inicial de leguminosas arbóreas brasileiras, observaram que a nodulação foi relativamente alta em *E. contortisiliquum* e *Lonchocarpus muehlbergianus*, quando comparadas com as outras espécies estudadas. Esses resultados evidenciam que essas espécies apresentam vantagens para se estabelecer em solos com baixos níveis de nitrogênio.

Estudos que avaliam a ocorrência e eficiência de populações de bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas arbóreas, podem fornecer informações importantes quanto à existência de estirpes nativas eficientes. Essas bactérias poderão ser

isoladas e selecionadas para potencial uso como inoculantes, especialmente em ecossistemas tropicais, onde os solos, geralmente, apresentam elevadas temperaturas, pH ácido e baixa disponibilidade de nutrientes (NOVAIS et al., 2007).

A estirpe *Bradyrhizobium* sp. (BR 4406) foi aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso como inoculante em *E. contortisiliquum* (Brasil, 2011). No entanto, estudos verificaram baixa eficiência dessa estirpe em mudas de *E. contortisiliquum* (SOARES e RODRIGUES, 2008; SOUSA et al., 2013; JESUS et al., 2014). Porém, em estudo conduzido por Fernandes et al. (2017), em uma área degradada no município de Santa Luz-PI, foi verificado que a estirpe *Bradyrhizobium* sp. (BR 4406) foi benéfica para o estabelecimento e crescimento de mudas de *E. contortisiliquum*.

Assim, torna-se necessária a busca por estirpes nativas eficientes em *E. contortisiliquum* que possam ser utilizadas na produção de mudas mais saudáveis e com maior probabilidade de sucesso no campo.

3.3 Fixação biológica de nitrogênio

A disponibilidade de nutrientes no solo limita a dinâmica dos ecossistemas terrestres e a produtividade agrícola. O nitrogênio (N), por exemplo, é um constituinte dos ácidos nucleicos e de proteínas, sendo moléculas importantes para todos os processos biológicos das plantas, como na formação de raízes, fotossíntese, produção e translocação de fotoassimilados, na respiração e na taxa de crescimento entre folhas e raízes. Conseqüentemente, a ausência desse macronutriente, torna-se um fator limitante em sistemas agrícolas e naturais.

O ciclo biogeoquímico do N é considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O nitrogênio é apontado como o quinto elemento mais abundante no universo, perdendo em quantidade apenas para hidrogênio, hélio, oxigênio e neônio (HILY-BLANT et al., 2010). Na atmosfera, o nitrogênio apresenta-se com uma proporção estimada entre 76 e 78% na forma de dinitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Apesar da alta disponibilidade na natureza, os vegetais não conseguem realizar assimilação direta desse nutriente na forma de N₂, em virtude da alta estabilidade da molécula, com a presença de uma tripla ligação covalente que une os dois átomos de nitrogênio (REIS et al., 2005).

Todavia, quatro principais fontes são utilizadas pelas plantas para assimilação do

N, sendo elas: o solo, a fixação não biológica, fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N_2) (HUNGRIA et al., 2007). No solo, o nitrogênio disponível advém da decomposição/mineralização da matéria orgânica, que pode ser esgotada após alguns cultivos. A fixação não biológica é resultante de processos naturais, como as reações de descargas elétricas com o N_2 , a combustão e o vulcanismo.

Os fertilizantes nitrogenados são produzidos industrialmente a partir da transformação do N_2 em amônia (NH_3) e representam a forma mais rápida de assimilação do nutriente pelas plantas. Entretanto, o uso desses fertilizantes encarece os sistemas produtivos pelo seu alto custo (HUNGRIA et al., 2007). O uso de fertilizantes nitrogenados quando é intensivo e irregular pela sua alta mobilidade no solo, pode ser facilmente perdido por lixiviação e não absorvido pelas plantas, além da possibilidade de contaminação do lençol freático (HARDY, 1968; DUQUE et al. 1985).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo que traz benefícios para os sistemas agrícolas, tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, uma vez que pode suprir parcial ou totalmente a necessidade de aplicação de nitrogênio sintético nas lavouras e, conseqüentemente, favorece um ecossistema em equilíbrio (SANTACHIARA et al., 2017; DOS SANTOS BRANCO e JUNIOR, 2022; GOYAL; SCHMIDT; HYNES, 2021). A FBN é o

principal processo de entrada de nitrogênio nas cadeias alimentares, o que ressalta ainda mais a importância ecológica desse processo nos ambientes naturais.

Nos ecossistemas terrestres, estima-se que cerca de 175 milhões de toneladas de nitrogênio atmosférico são fixadas por ano pelo processo de FBN (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Como exemplo, na produção de soja no Brasil, resultados demonstram que o processo de FBN foi capaz de aumentar 8% na produção de grãos com a inoculação anual, sem a necessidade de suplementação com fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA e MENDES, 2015).

As bactérias diazotróficas, responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio, podem ser classificadas em três grandes grupos: diazotróficas de vida livre, associativas/endofíticas e simbióticas (EVANS e BURRIS, 1992). A FBN realizada por organismos de vida livre é caracterizada como uma vantagem evolutiva, pois não requer a especificidade necessária para estabelecer relações internas com plantas. Neste caso, a colonização nas raízes das plantas não é necessária, e essas bactérias heterotróficas, requerem apenas um ecossistema capaz de lhes disponibilizar uma fonte de carbono utilizável (MOREIRA et al., 2010).

Nas diazotróficas associativas, as bactérias contribuem para o desenvolvimento das plantas, fornecendo-lhes nitrogênio, mas sem a necessidade de infecção. O grupo de

diazotróficos associativos é bem diverso e de acordo com Baldani et al. (1997), este ainda pode ser dividido em endofíticos facultativos, que podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes, e os endofíticos obrigatórios, que colonizam o interior das raízes.

As bactérias diazotróficas associativas já foram relatadas em várias culturas, como arroz, milho, melão, sorgo, trigo, cana-de-açúcar e gramíneas forrageiras (RODRIGUES et al., 2006; SALA et al., 2008; FRACETTO et al., 2019; SEIDO et al., 2019; BONFIM et al., 2020; SCUDELETTI et al., 2023). Como grupo predominante nos diazotróficos endofíticos pode ser citado os gêneros *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas* (MONTEIRO, et al., 2012; VARGAS et al., 2012).

Além do fornecimento de nitrogênio, as bactérias diazotróficas associativas contribuem na aquisição de outros nutrientes, como fósforo e ferro (SINGH et al., 2018), sintetizam e fornecem fito hormônios vegetais, incluindo auxinas, citocininas e giberelinas (SINGH et al., 2018; GLICK, 2020). Esses fitohormônios em baixas quantidades, atuam na regulação de crescimento das plantas, influenciando os seus processos fisiológicos (PEIXOTO NETO et al., 2002; DOBBELAERE et al., 2003).

O grupo das bactérias simbióticas habitam o solo e estão disponíveis em grande quantidade e diversidade, podendo contribuir com altas quantidades de nitrogênio para as plantas através de relações mutualistas (SANTACHIARA et al., 2017; CIAMPITTI; SALVAGIOTTI, 2018; EMBRAPA, 2019). Essa relação ocorre porque esses microrganismos possuem um complexo enzimático nitrogenase, capaz de realizar a quebra da ligação tripla do N_2 , usando energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP). Dessa forma, ocorre a redução do nitrogênio atmosférico para a forma inorgânica combinada NH_3 assimilável pelas plantas (REISE TEIXEIRA, 2005).

As bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) que estabelecem relação simbiótica com leguminosas (*Fabaceae*) instalam-se nos pelos radiculares e multiplicam-se rapidamente, formando nódulos resultantes da íntima interação entre bactéria/planta. Essa associação possibilita converter o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), que é fornecido para a planta hospedeira e utilizado para seu desenvolvimento (GOYAL et al., 2021). Durante o processo de nodulação, existem genes responsáveis pela comunicação química entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira, denominados de genes de nodulação (*nod*). Os genes *nod* codificam as proteínas que dão origem aos fatores *Nod*, que são lipo-oligosacarídeos que desencadeiam o início do desenvolvimento do nódulo (YANG et al., 2022).

Para que essa associação aconteça são incluídos vários processos, como: o

reconhecimento de simbioses, infecção e colonização das plantas pelas bactérias, formação dos nódulos radiculares e fixação do N₂. Alguns métodos genéticos e moleculares são utilizados na identificação de organismos fixadores de N₂ (VITOUSEK et al., 2013), como o reconhecimento dos principais genes envolvidos no processo de FBN (*nod* e *nif*), através da técnica PCR (polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase) (SHAMSELDIN, 2013).

O processo de simbiose, inicia-se com a liberação de exsudados pelas raízes de plantas leguminosas, dotados de compostos fenólicos conhecidos como flavonóides. Esses compostos podem ou não ativar a expressão dos genes *nod* na bactéria. Uma vez ativada, ocorre a produção e secreção de um conjunto de sinais moleculares chamados de fatores *nod* que podem provocar as respostas necessárias da planta para a infecção da raiz e desenvolvimento dos nódulos pelos rizóbios (LINDSTRÖM e MOUSAVI, 2020).

Diversas espécies de bactérias pertencentes às subclasses α e β -proteobacteria já foram descritas como nodulíferas em leguminosas. Entre as α -proteobactérias, encontram-se os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, conhecidos como os gêneros “clássicos” de rizóbios. Ainda na mesma subclasse, encontram-se os gêneros “novos” de rizóbio: *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Aminobacter*, *Allorhizobium*, *Microvirga*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Shinella* e *Neorhizobium* (PEIX et al., 2015; ORMENO- ORRILLO et al., 2015). Na subclasse β -proteobacteria, estão classificados os gêneros de “novos” rizóbios *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (MOULIN et al., 2001; SAWANA et al., 2014; PEIX et al., 2015).

Além de atuar na FBN, os rizóbios podem também promover o crescimento das plantas por meio de outros processos, como pela proteção das plantas aos danos causados pela produção de etileno em condições de estresses bióticos ou abióticos (GLICK, 2014), pois elas sintetizam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, que cliva o ACC, precursor imediato do etileno em todas as plantas superiores (SINGH et al., 2018; GLICK, 2020). O etileno é um hormônio vegetal que pode inibir o alongamento das raízes, nodulação e transporte de auxinas, além de promover hipertrofias, senescência e abscisão de órgãos (SALEEM et al., 2007; YANG et al., 2009).

Além disso, estudos apresentaram resultados positivos para inoculação e co-inoculação de bactérias simbióticas (HUNGRIA et al., 2013; BARBOSA et al., 2022). A pesquisa de Barbosa et al. (2022) avaliaram a co-inoculação de rizóbios com *Trichoderma* e observaram que as plantas submetidas a este tratamento apresentaram diminuição da incidência de doenças, aumento da massa de raízes, número de nódulos, massa de nódulos,

atividade de nitrogenase do nódulo, parte aérea, teor de nitrogênio e rendimento de grãos.

Hungria et al. (2013), estudaram a ação combinada de rizóbios e inoculantes de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na produtividade de soja e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante um ano. A inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* aumentou a produtividade da soja em média 222 kg ha⁻¹ e a co-inoculação (*Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense*) em sulco em média 427 kg ha⁻¹. A co-inoculação das sementes com ambos os microrganismos resultou em um aumento médio de rendimento de 420 kg ha⁻¹ com maior produção de biomassa de nódulos e rendimento de grãos na soja em relação ao controle não inoculado.

Ainda nessa pesquisa, a cultura do feijão com a inoculação das sementes com *Rhizobium tropici* aumentou a produtividade em 98 kg ha⁻¹, enquanto a co-inoculação (*Rhizobium tropici* + *A. brasilense*) em sulco resultou no aumento de 285 kg ha⁻¹. Esses autores concluíram que o tratamento inoculado produziu rendimentos equivalentes ao tratamento não inoculado.

Os inoculantes são produtos que contém grandes quantidades de microrganismos vivos benéficos ao desenvolvimento de espécies vegetais, e os rizóbios foram os primeiros microrganismos utilizados como inoculantes (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). A inoculação de estirpes selecionadas e de comprovada eficiência é uma das alternativas mais viáveis, ecológica e economicamente, podendo alcançar produções equivalentes às obtidas com fertilizantes nitrogenados, além de diminuir o uso e o impacto causado por eles (DOBEREINER e DUQUE, 1980).

A inoculação com rizóbios é indicada, geralmente, para ambientes nas seguintes condições: quando não existe rizóbios compatíveis, onde a população no solo é reduzida ou em ambientes que a comunidade nativa das bactérias diazotróficas possui baixa eficiência (LIU e MURRAY, 2016). Atualmente é um produto bastante indicado na agricultura, principalmente em culturas leguminosas, como soja e feijão. Entretanto, a produção de inoculantes para outras leguminosas e não leguminosas tem aumentado a fim de obter maior rendimento (SANTOS et al., 2019).

Viabilizando a sustentabilidade e a segurança alimentar nos sistemas agrícolas dos trópicos, pesquisadores, organizações governamentais e agricultores vêm dando mais atenção ao manejo das bactérias fixadoras de nitrogênio, a associação entre leguminosas arbóreas e bactérias diazotróficas podem fornecer benefícios ecossistêmicos, como maior produção de biomassa, ciclagem de nutrientes e maior fixação de N₂ (MEDINSKI e FREESE, 2012).

3.4 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas arbóreas no Semiárido

A simbiose entre leguminosas e rizóbios representa um importante papel no bioma Caatinga, pois melhoram a produtividade das plantas (PEREYRA et al., 2015). Espécies nativas, frequentemente, obtêm mais de 80% da sua necessidade de N por fixação simbiótica (TEIXEIRA et al., 2006; FREITAS et al., 2010; ANDREWS et al., 2011). Entretanto, não são todas as leguminosas que possuem capacidade de se associar com as bactérias fixadoras, variando de acordo com as subfamílias, gêneros e espécies (ALLEN e ALLEN, 1981; SPRENT, 1995). Normalmente, uma leguminosa pode se associar com uma quantidade limitada de espécies de rizóbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; LIU e MURRAY, 2016;).

Na região Semiárida, as leguminosas que conseguem se associar de maneira eficiente com bactérias fixadoras de nitrogênio obtêm mais da metade de seu N por meio da FBN (ANDREWS et al., 2011). Nascimento (2013) avaliou a contribuição da FBN na nutrição de mudas de duas leguminosas arbóreas, leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) e a sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.), cultivadas em solos do Semiárido nordestino e verificaram contribuições de até 99%.

Apesar da importância, são escassas as informações sobre a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas arbóreas nos solos do Semiárido brasileiro, especialmente em leguminosas nativas (FREITAS et al., 2010; NASCIMENTO, 2013; MARTINS et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; DIAS et al., 2021). Por outro lado, essa temática é amplamente explorada para as espécies de interesse agrônomo como soja (HUNGRIA et al., 2006) e feijão-caupi (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; SEIDO et al., 2019; SENA et al., 2020).

Martinez Alcantara et al. (2020), estudando a diversidade de bactérias endofíticas em leguminosas arbóreas da Argentina, identificaram um microrganismo fixador de nitrogênio nos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*, o *Bradyrhizobium lianonginese*. Entretanto, esses autores afirmam que não há muitos relatos sobre essa espécie na literatura. No Brasil, Trannin et al. (2001) identificando plantas tolerantes a áreas degradadas por excesso de metais pesados, identificaram a tolerância de *E. contortisiliquum* a essas áreas como também identificaram nos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*, um microrganismo fixador de nitrogênio nos nódulos dessa espécie, o *Bradyrhizobium*.

Estudos mostram que solos tropicais possuem comunidades nativas de rizóbios com alta diversidade e eficiência variada (LIMA et al., 2009; AZARIAS GUIMARÃES et al.,

2012; COELHO et al., 2018). Essa grande variabilidade encontrada entre as estirpes de comunidades nativas se deve, em grande parte, a submissão delas a inúmeros estresses e interações naturais, em virtude dos fatores edafoclimáticos (DA SILVA et al., 2016; SANTACHIARA; SALVAGIOTTI; ROTUNDO, 2019). Dessa forma, tornam-se fonte de variabilidade genética na busca de linhagens que possam ser utilizadas como inoculantes.

3.5 Técnicas de biologia molecular para analisar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio

Constantemente são descobertas novas espécies de bactérias capazes de nodular leguminosas. Isso ocorre devido, principalmente, a alguns fatores, tais como: uso de ferramentas de biologia molecular para caracterização da diversidade e identidade genética de procariotos; levantamento da diversidade feito em áreas pouco exploradas; ascensão do estudo em leguminosas nativas. Dessa forma, espécies de bactérias são realocadas e novos táxons são descritos para acomodar novas estirpes. Esses fatores juntos fazem com que a taxonomia esteja em frequente alteração (LEITE, 2015; OREN e GARRITY, 2021).

A diversidade e riqueza das bactérias diazotróficas podem ser estudadas por diferentes formas, como a utilização da técnica de biologia molecular, que possibilita o estudo dos microrganismos pela detecção de ácidos nucleicos de maneira muito precisa (ANDREOTE et al., 2009; PATEL e ARCHANA, 2017). Essas técnicas permitem a identificação de rizóbios em nível genético, linhagem, gênero, espécie ou níveis superiores (MOURA et al., 2020).

A Polymerase Chain Reaction (PCR) é uma técnica muito sensível, possibilitando a amplificação do DNA a partir de uma quantidade mínima de amostras. A técnica permite à amplificação “in vitro” de partes definidas do DNA obtendo várias cópias de um determinado segmento de ácido desoxirribonucleico. Consiste em uma reação catalisada por uma enzima termoestável: a DNA polimerase e componentes como desoxirribonucleotídeos (dNTP's) e primers ou oligonucleotídeos. A PCR é processada automaticamente em um aparelho termociclador programado para a realização de ciclos repetidos de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

O duplex-PCR é um protocolo adaptado por Fernandes Júnior et al. (2013) que possibilitou a amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC*, que são considerados os principais genes envolvidos no processo de FBN (SHAMSELDIN, 2013). Esse protocolo contribuiu para a redução do trabalho e do tempo gasto com a autenticação das bactérias isoladas de nódulos das coleções de culturas. Além disso, apresenta vantagem sobre a detecção

de um único *amplicon*, pois reduz o custo das reações e maximiza a utilização dos equipamentos possibilitando o teste de um maior número de isolados ao mesmo tempo.

O gene *nodC* está envolvido na constituição da molécula lipo-quito-oligossacarídeos, responsáveis pelo processo de nodulação (KAMST et al. 1997). O gene *nifH* codifica a subunidade nitrogenase redutase do complexo enzimático da nitrogenase, enzima responsável pela conversão do N₂ em amônia (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). O *nifH* é bastante utilizado em estudos de filogenia entre os *Rhizobium*, pois diversas espécies já foram catalogadas com essas sequências para possíveis comparações (SHAMSELDIN, 2013).

Em pesquisa realizada por Silva et al. (2019), foi desenvolvido uma abordagem simples de duplex-PCR para a amplificação de genes simbióticos. Os autores verificaram amplificação positiva em diversos rizóbios, tanto alfa como beta-rizóbios, indicando a abordagem como eficazna seleção preliminar de rizóbios.

Em estudos com alta diversidade de rizóbios, os marcadores moleculares de *fingerprint* são fundamentais e frequentemente utilizados para identificar linhagens de bactérias em uma coleção. Os principais marcadores de *fingerprint* utilizados para caracterizar grandes coleções derizóbios são: REP-PCR (MISHRA et al., 2012), ERIC-PCR (RASHID et al., 2012), BOX-PCR (ROUWS et al., 2014), RAPD (VAN CAUWENBERGHE et al., 2014), (GTG)₅ (DE MEYER et al., 2015) e ARDRA (REIS JUNIOR et al., 2004). Esses marcadores conseguem identificar sequências repetidas de DNA (rep-PCR) dentro do genoma da bactéria. Após uma PCR é gerado um perfil composto por fragmentos de DNA (bandas) de diversos tamanhos, que pode ser visualizado em gel de agarose (LEITE et al., 2015).

A técnica de BOX-PCR é capaz de diferenciar estirpes muito próximas dentro das espécies de rizóbios, pois permite avaliar a amplificação das sequências repetidas no genoma bacteriano (STOCCO et al., 2008). Os primers BOX geram impressões digitais (*fingerprints*) mais robustas, produzindo padrões de fragmentos mais diversos. Adicionalmente, sua metodologia é de fácil compreensão e execução, rápida e de baixo custo (MISHRA et al., 2015).

A partir desta prévia classificação é possível fazer a seleção de representantes para serem utilizados em técnicas mais aprofundadas de filogenia, sem a necessidade de realizar a completa caracterização da coleção (VAN CAUWENBERGHE et al., 2014). A Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), por exemplo, é uma técnica bastante utilizada e muito útil para fins de detecção de polimorfismo em fragmentos de DNA de bactérias. Para isso são utilizadas enzimas com habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA (REIS JUNIOR et al, 2004).

Outra forma mais aprofundada na identificação de linhagens bacterianas dentro de uma população de rizóbios é através da técnica de restrição do gene 16S rRNA (GUEFRACHI et al., 2013) ou do espaço intergênico 16S-23S (LI et al., 2012) são técnicas que geram perfis de fragmentos de DNA (bandas). O gene 16S rRNA é considerado um bom marcador filogenético porque conserva algumas regiões que são necessárias para identificar relações filogenéticas entre espécies distantes e também regiões mais variáveis, importantes para diferenciar espécies próximas (MOURA et al., 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solo: Origem, coleta e análise

A coleta dos solos foi realizada em cinco cidades do estado de Pernambuco, em fevereiro de 2020. Na tabela 1 é apresentado a origem, classificação do solo, altitude, precipitação média anual, temperatura média anual, longitude, latitude e elevação dos locais de coleta dos solos.

Tabela 1. Origem, classificação do solo, precipitação, temperatura anual e descrição da longitude, latitude e elevação dos locais de coleta dos solos.

Município	Classe de solo	Altitude (m)	Precipitação média anual (mm)	Temp. média anual	Coordenadas (UTM)		
					Long.	Lat.	Elevação
Betânia	Neossolo litólico	429	497	28 °C	638880	9106163	600 m
Parnamirim	Luvisolo crômico	392	544	26 °C	437036	9106441	360 m
Santa Cruz	Latossolo amarelo	515	502	24,3 °C	349722	9073428	505 m
Santa Maria da Boa Vista	Argissolo amarelo	407	493	28 °C	417972	9038394	343 m
Serra Talhada	Neossolo litólico	444	648	23,8 °C	578955	9126123	536 m

Fonte: Elaborada pela autora, 2023. - Temp. = temperatura; Long. = longitude; Lat. = latitude.

Foram coletadas amostras de solo rizosférico em áreas de mata fechada nos cinco municípios. Essas amostras foram coletadas ao redor das raízes das leguminosas arbóreas presentes nessas áreas, correspondendo a uma área localizada geralmente entre 1 e 3 mm, de acordo com Hiltner (1904). Os solos coletados foram acondicionados em sacos de rafia com

capacidade para 50 kg, levados para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido (LMS), em Petrolina-PE, e armazenados em câmara fria com temperatura de 4 °C.

A análise do solo foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela Embrapa (1997). Uma amostra de cada solo com aproximadamente 200 g foi avaliada no Laboratório de Solos e Tecidos Vegetais da Embrapa Semiárido, para as seguintes análises: condutividade elétrica (CE), pH, carbono (C), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), alumínio (Al^{3+}), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) (Tabela 3).

Tabela 2. Caracterização química das amostras de solo de cinco municípios no estado de Pernambuco.

DETERMINAÇÃO																	
Localidade	C.E	pH	C	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Mn	Zn
	mS cm⁻¹	-	g kg⁻¹	mg dm⁻³				cmol c dm⁻³					%		mg dm⁻³		
BETÂNIA	0,29	6,10	0	7,91	0,41	0,07	5,27	2,17	0	1,93	7,90	9,83	75,63	0,88	44,63	46,39	6,50
PARNAMIRIM	0,61	6,60	0	59,98	0,52	0,08	6,73	2,43	0	1,60	9,77	11,37	81,03	0,62	29,57	26,19	3,50
SANTA CRUZ	0,27	4,40	0	2,19	0,07	0,01	0,70	0,30	0,60	5,77	1,03	6,83	69,93	0,51	118,59	3,09	1,53
SANTA MARIA DA BOA VISTA	0,37	5,43	0	2,07	0,28	0,04	1,77	0,70	0,03	1,70	2,77	4,47	48,90	1,17	21,88	37,22	2,04
SERRA TALHADA	0,24	4,77	0	5,82	0,22	0,08	1,33	0,63	0,37	3,63	2,27	5,90	14,90	0,77	46,96	11,02	2,28

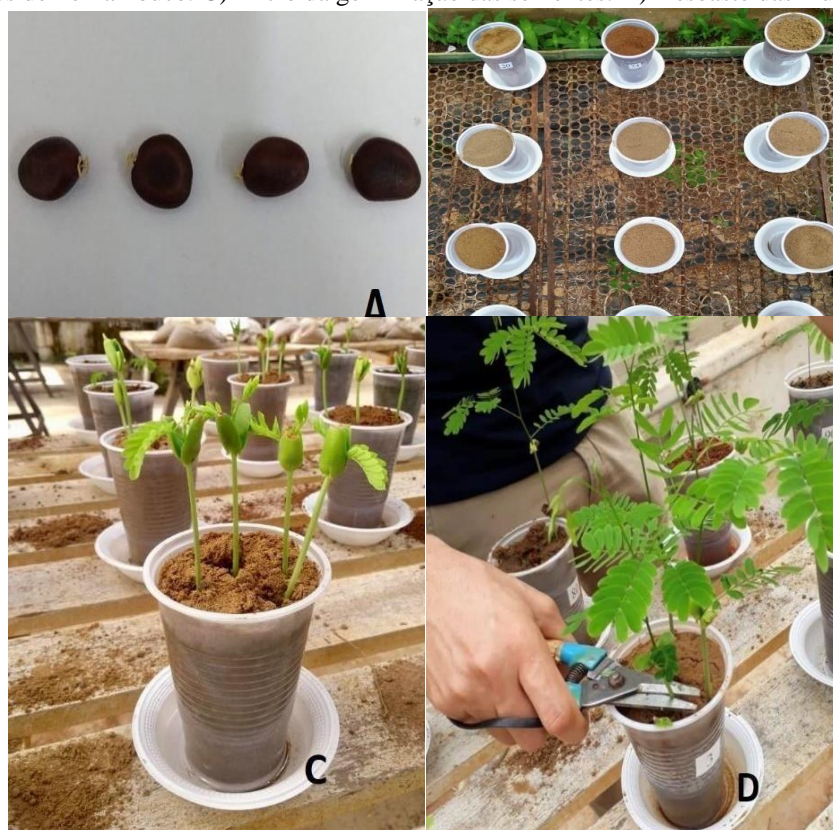
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

4.2 Experimento para captura dos isolados utilizando *Enterolobium contortisiliquum* como planta-isca

Para obtenção dos isolados, foi conduzido um experimento, em condições de viveiro, utilizando-se *Enterolobium contortisiliquum* como planta-isca, na Embrapa Semiárido, em Petrolina-PE.

O experimento foi montado em vasos com solo com capacidade de 0,5 L. Previamente, os solos foram destorroados e peneirados em peneira com malha de 55µm. As sementes de *E. contortisiliquum* foram obtidas do Laboratório de Sementes da Embrapa Semiárido. Antes do plantio, as sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 96% GL por 30 segundos, hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) por 5 minutos, seguidas por dez lavagens em água destilada estéril (ADE). Em seguida, foram levadas para o viveiro para fazer a semeadura (Figura 1).

Figura 1. Experimento para para captura dos isolados utilizando *Enterolobium contortisiliquum* como planta-isca. A) Sementes de *Enterolobium contortisiliquum*. B) Vasos de 0,5 L com as sementes plantadas nos diferentes solos de Pernambuco. C) Início da germinação das sementes. D) Desbaste das mudas.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições para cada solo, totalizando 30 vasos. Quatro sementes foram semeadas por vaso. As plantas receberam água conforme necessário. O desbaste foi realizado 15 dias após o plantio, deixando-se uma planta por vaso. A coleta do experimento foi realizada aos 95 dias após o plantio. As plantas foram retiradas dos vasos e as raízes separadas da parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente e os nódulos foram destacados para posterior desinfestação e isolamento das bactérias.

4.3 Isolamento, purificação e estoque dos isolados bacterianos

Na perspectiva de minimizar qualquer alteração nas amostras, no mesmo dia em que os nódulos foram coletados, iniciou-se o processo de isolamento e purificação.

Em capela de fluxo laminar os nódulos foram desinfestados superficialmente em etanol comercial (96% v/v por 30 segundos) e em hipoclorito de sódio comercial (2,5% v/v por 5 minutos), seguidos por 10 lavagens em água destilada estéril (ADE) (DA COSTA et al., 2014). Após a desinfestação, com uma pinça esterilizada por flambagem, os nódulos foram espremidos em placas de Petri contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar) composto por manitol (fonte de carbono), extrato de levedura (fonte de nitrogênio) e sais minerais (FRED e WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970). Azul de bromotimol foi adicionado como indicador de pH. O pH do meio YMA ficou entre 6,8 a 7,0. Em seguida, foram armazenadas na sala de incubação com temperatura ambiente.

De acordo com o crescimento de cada isolado (lento, intermediário e rápido), ao surgir colônias isoladas, estas foram transferidas para novas placas de Petri contendo meio de cultura YMA, com azul bromotimol. Foram realizadas sucessivas repicagens até a obtenção de culturas puras.

Ao obter as colônias puras, cada amostra foi transferida da placa de Petri para tubo de ensaio em poliestireno, com auxílio de uma alça de níquel. Nesse tubo, foi adicionado 5 ml de YM, sem indicador. Em seguida, os tubos foram levados e mantidos sob agitação constante de 120 rpm em mesa agitadora a temperatura ambiente, pelo tempo de crescimento adequado para cada estirpe (rápido, intermediário, lento), até o momento em que o meio de cultura passa de transparente para turvo.

Para preservar os isolados, foi retirado 1 ml do meio líquido YM, com culturas de células, para centrifugar em microtubos tipo Eppendorfs a 10.000 g por três minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao precipitado 1 ml de ADE com 25%

(v/v) de glicerol que posteriormente foram armazenados em caixa no UltraFreezer a -80 °C.

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Extração de DNA das estirpes bacterianas

Iniciou-se o processo de extração de DNA retirando uma alíquota da colônia de bactéria pura e colocadas para crescer em tubos de ensaio, com 5 ml de YM meio líquido sem indicador e mantidas sob agitação constante de 120 (rpm) pelo tempo de crescimento adequado para cada estirpe.

O DNA foi extraído por meio de kit comercial para extração de DNA genômico (LGC Biotecnologia), de acordo com instruções do fabricante. Para verificação dos produtos da extração, o DNA foi corado com DiamondTM Nucleic Acid Dye (Promega) na proporção de 2:2 e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de tampão tris- bórico-EDTA (TBE) 0,5X em eletroforese horizontal com voltagem de 120 V por aproximadamente 30 minutos – Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Os géis foram visualizados em transluminador (Loccus Biotecnologia), acoplado ao fotodocumentador (Modelo UVDoc 400i - Delpho Instruments), e fotografado com câmera digital (Canon EOS Rebel T5i). As amostras de DNA foram armazenadas em Freezer a -20 °C.

4.4.2 Duplex-PCR: Amplificação simultânea dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*

Após a extração de DNA, cada estirpe foi analisada quanto à amplificação de fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e/ou *nodC* de acordo com o protocolo estabelecido por Silva et al. (2019), o duplex-PCR.

A amplificação do gene *nifH*, foi realizada com os iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') e PoIR (5'ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (POLY et al., 2001). Para o gene *nodC*, foram utilizados os iniciadores NodCforBurk (CTCAATGTACACARNGCRTA) e NodCrevBurk (GAYATGGARTAYTGGYT) (ELLIOTT et al., 2007) como tentativa de amplificar um fragmento do gene em bactérias do gênero *Paraburkholderia* ou outros beta rizóbios, além dos os iniciadores NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para a amplificação de um fragmento interno ao gene *nodC* em alfa rizóbios (LAGUERRE et al., 2001).

As reações de PCR resultaram em um volume final de 10 µL contendo: tampão de reação 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 1,2 mM, Taq DNA polimerase 0,25 U, os iniciadores do gene *nifH* e *nodC* (0,75 µM) e água ultrapura autoclavada. As amostras de DNA (1 µL) foram adicionadas ao mix e levadas ao termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação inicial (5 minutos a 94 °C), 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), anelamento (45 segundos a 55 °C), extensão (1 minuto a 72 °C) e um ciclo de extensão final (10 minutos a 72 °C).

Os produtos da PCR foram corados com DiamondTM Nucleic Acid Dye (Promega) na proporção de 2:2 e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X em eletroforese horizontal com voltagem de 120 V por aproximadamente 40 minutos - Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Os géis foram visualizados em transluminador (Loccus Biotecnologia), acoplado ao fotodocumentador (Modelo UVDoc 400i - Delpho Instruments), e fotografado com câmera digital (Canon EOS Rebel T5i). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc), foram identificados os isolados que apresentaram amplicons de *nodC* com aproximadamente 630-650 pb e *nifH* com 360 pb. Os isolados que mostraram amplificação positiva para os dois ou um dos dois genes avaliados (*nifH* e/ou *nodC*) foram selecionados para continuação das análises moleculares.

4.4.3 BOX-PCR dos isolados

Após selecionar as estirpes que apresentaram os genes *nifH* e/ou *nodC* foi realizado a análise do Box-PCR que é um “fingerprinting” molecular para identificar isolados idênticos. Utilizou-se o iniciador Box A1 (VERSALOVIC et al., 1994). As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems) para um volume final de 20 µL, utilizando: Buffer 1X, 3,0 mM MgCl₂, dNTP 1,5 mM, 1,0 µM do iniciador BOX A1, 0,25 U Taq DNA polimerase, 2µL de DNA e o volume completado para 20 µL com água ultrapura autoclavada.

A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: uma desnaturação inicial de 94 °C por 6 min, 32 ciclos a 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 2:30s e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram corados com DiamondTM Nucleic Acid Dye (Promega) na proporção de 2:2 e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X, e submetidos à eletroforese horizontal a 90 V por 180 minutos - Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para a estimativa dos tamanhos

moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc). Posteriormente, o gel foi visualizado em transluminador (Loccus Biotecnologia), acoplado ao fotodocumentador (Modelo UVDoc 400i - Delpho Instruments), e fotografado com câmera digital (Canon EOS Rebel T5i). Todos os perfis foram avaliados com auxílio do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica).

4.4.4 Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) dos isolados

Posteriormente a etapa do BOX-PCR, em que foi realizada a eliminação dos isolados idênticos, os demais isolados foram submetidos a análise do ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal). ARDRA é uma técnica utilizada na perspectiva de identificar a diversidade genética das bactérias isoladas. Para isso, os isolados tiveram a região do DNA que codifica o gene 16S rRNA amplificada por PCR para a determinação do seu posicionamento taxonômico.

Para isso, foi utilizado os oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar o gene 16S rRNA Y1 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) e Y3 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC) (YOUNG et al., 1991). As amplificações por PCR tiveram um mix com volume final de 30 µL, tampão 1x, 2mM de MgCl₂, dNTP 0,5 mM, 0,2 µM dos iniciadores, 0,25 U Taq DNA polimerase, 3,0 µL de DNA e água ultrapura autoclavada.

As condições da reação foram: um ciclo de desnaturação inicial (5 min a 94 °C), 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (2 min a 72 °C), extensão (1 min a 58 °C), seguido por um ciclo de extensão final (5 min a 72 °C). As amostras foram levadas ao termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems), e os fragmentos amplificados foram corados com DiamondTM Nucleic Acid Dye (Promega) e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X, submetidos à eletroforese horizontal a 90 V por 130 minutos - Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc). Os géis foram visualizados e documentados em um fotodocumentador sob luz - UV LPix-STi (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Após a amplificação do gene 16S rRNA, as amostras foram digeridas por três enzimas: *ALU*, *HhaI* e *HaeIII*, conforme as orientações do fabricante. O volume final da reação foi 10 µL, (5 µL da reação de PCR e 5 µL de mix de reação com endonucleases). As reações ocorreram durante 12 horas a 37 °C e os produtos da digestão foram corados com DiamondTM

Nucleic Acid Dye (Promega) e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X, submetidos a eletroforese horizontal a 90 V por 180 minutos - Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc). Posteriormente, os géis foram visualizados em transluminador (Loccus Biotecnologia), acoplado ao fotodocumentador (Modelo UVDoc 400i - Delpho Instruments), e fotografado com câmera digital (Canon EOS Rebel T5i).

4.4.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise filogenética

Foram selecionados 32 isolados de acordo com as seleções das análises anteriores e representantes dos solos de cada município. Para isso, a amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando as mesmas condições e iniciadores descritos anteriormente para análise de restrição. Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados com o kit comercial *EacyPure PCR Purification kit* (TRANSGEN BIOTECH – China).

Os produtos foram corados com Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) e aplicado ao gel de agarose a 1% na presença de TBE 0,5X, submetidos à eletroforese horizontal a 90 V por 130 minutos - Electrophoresis Power Suply (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc). Os géis foram visualizados e documentados em um fotodocumentador sob luz - UV LPix-STi (Loccus Biotecnologia, Brasil). Em seguida, as amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada-RS).

Após a obtenção das sequências, a avaliação da qualidade foi realizada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) para verificar a similaridade com as sequências das estirpes tipo (*type strain*) utilizando-se a ferramenta “basic local alignment tool”, algoritmo Blastn (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências das estirpestipo com maior similaridade com os isolados rizobianos, foram baixadas para o alinhamento e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. O modelo Jukes-Cantor foi utilizado para a construção da árvore filogenética com auxílio do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018).

5 RESULTADOS

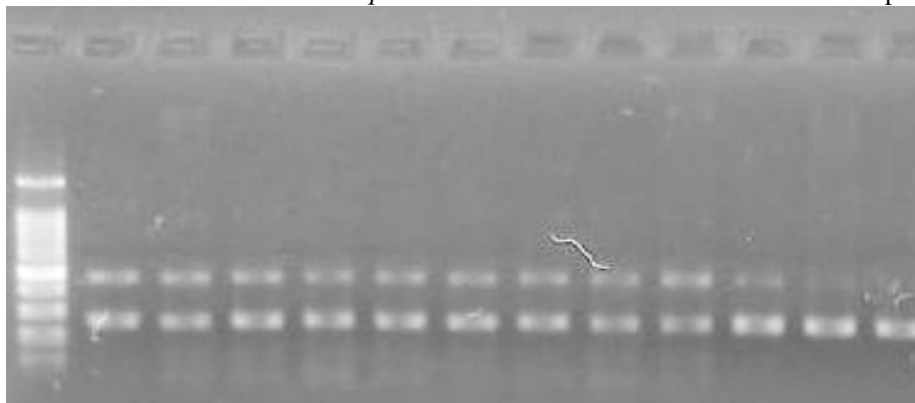
5.1 Avaliação da nodulação e isolamento de bactérias dos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* - experimento de planta-isca

Para o experimento de planta-isca com *Enterolobium contortisiliquum*, a quantidade de nódulos por planta, variou de zero a dez nódulos. Dentre os 30 vasos, apenas uma planta com solo da região de Santa Maria da Boa Vista -PE não apresentou nódulos. Dos 29 vasos resultaram em 127 nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*. As maiores quantidade de nódulos e isolados foram nos solos de Betânia (35 nódulos e 56 isolados), Serra Talhada (30 nódulos e 43 isolados) e Parnamirim (29 nódulos e 55 isolados). Nos solos de Santa Cruz e Santa Maria da Boa Vista, foram identificadas as menores quantidades de nódulos (19 e 14) e isolados (31 e 22), respectivamente. Após o isolamento e purificação das bactérias, foram obtidos uma coleção de 207 isolados bacterianos provenientes de nódulos radiculares de *E. contortisiliquum*.

5.2 Seleção dos isolados por meio do duplex-PCR

Após a extração de DNA dos 207 isolados, foi realizada a amplificação dos genes simbióticos *nifH* e/ou *nodC*, simultaneamente pela técnica de duplex-PCR. Dentre os 207 isolados, 93 apresentaram amplificação para um ou para os dois genes supracitados (Figura 2). A distribuição se deu da seguinte forma: *nifH* e *nodC*: 26 isolados (Santa Maria da Boa Vista: 9 isolados; Betânia: 5 isolados; Santa Cruz: 5 isolados; Parnamirim: 5 isolados; Serra Talhada: 2 isolados), *nifH* 61 isolados: (Betânia:23 isolados; Parnamirim: 15 isolados; Santa Cruz: 14 isolados; Santa Maria da Boa Vista: 6 isolados; Serra Talhada: 3 isolados), e *nodC*: 6 isolados (Santa Maria da Boa Vista: 3 isolados Betânia 2 isolados; Parnamirim: 1 isolado). Todos da nova coleção dos 93 isolados foram submetidos a análise dos perfis moleculares por meio de reação de BOX-PCR.

Figura 2. Amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodC* na reação de Duplex-PCR de isolados de nódulos radiculares de *Enterolobium contortisiliquum* oriundos de diferentes solos do Semiárido pernambucano.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

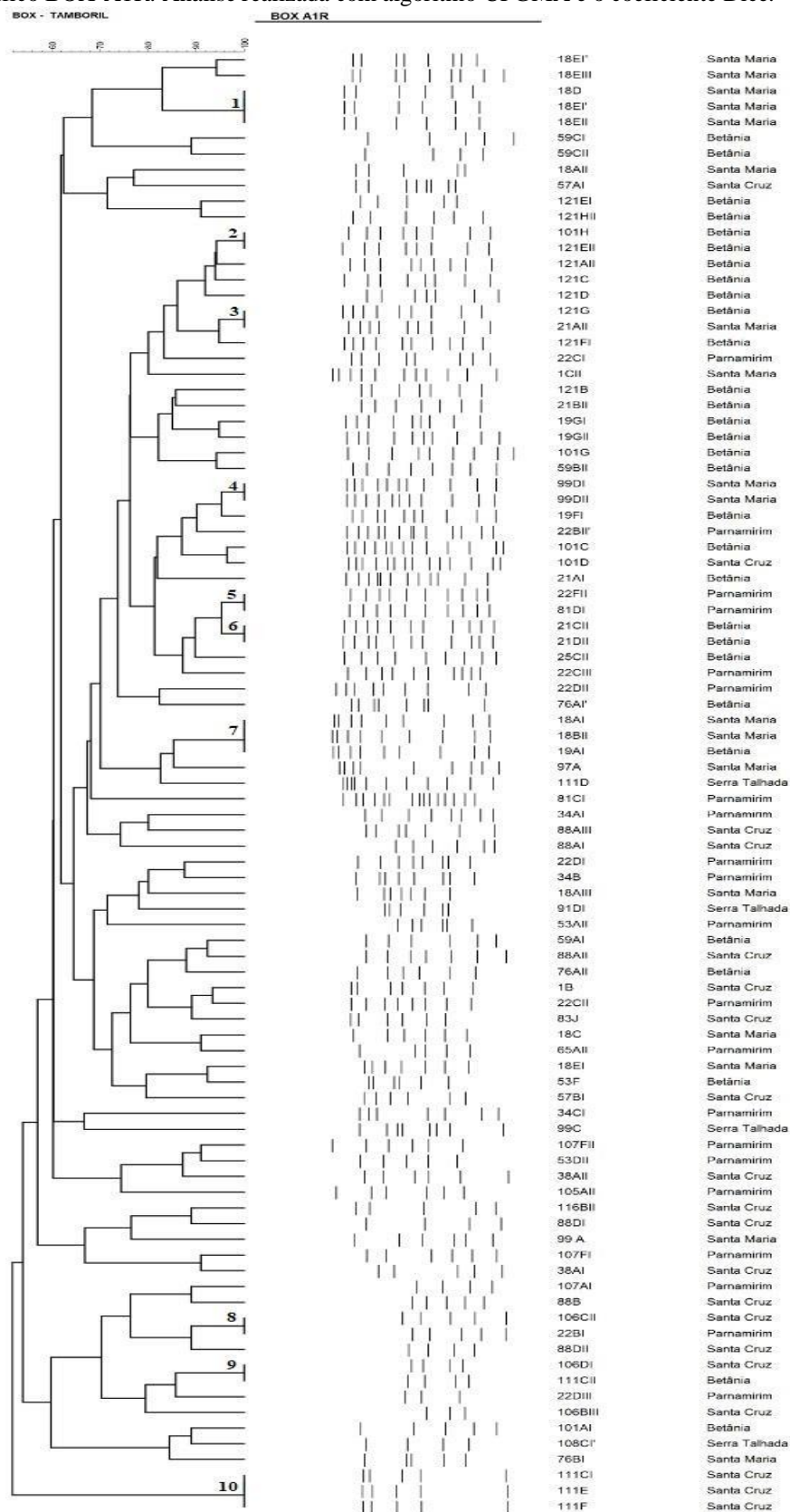
5.3 Fingerprinting molecular por BOX-PCR dos isolados de *Enterolobium contortisiliquum*

Usando a técnica de BOX-PCR para a análise da variabilidade genética dos 93 isolados que apresentaram amplificação para um ou para os dois genes simbióticos *nifH* e/ou *nodC*. A análise revelou que a maioria dos isolados de *Enterolobium contortisiliquum*, apresentaram perfis de bandas individuais únicos, confirmando um alto grau de variabilidade genética entre os isolados desses solos. Em seguida, foi construído um dendrograma de similaridade a partir dos dados gerados pela amplificação do oligonucleotídeo BOX-A1R (Figura 3).

A análise revelou que dez clusters apresentaram 100% de similaridade. Dentre esses dez, sete clusters (2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9) foram agrupados somente com dois isolados e os outros três clusters (1, 7 e 10) tiveram agrupamentos com três isolados. No primeiro cluster os três isolados (18D, 18E' e 18E'') são oriundos da mesma planta, do solo de Santa Maria da Boa Vista. O sétimo cluster apresentou dois isolados (18AIE e 18BII) da mesma planta, do solo de Santa Maria da Boa Vista e o terceiro isolado (19AI), pertence ao solo de Betânia. O décimo cluster apresentou 3 isolados (111CI, 111E e 111F) que pertencem à mesma planta, do solo de Santa Cruz.

O resultado da análise com 100% de similaridade, confirma a alta variabilidade genética entre os rizóbios de solos de Pernambuco. Ao final, removeu-se os isolados considerados idênticos e estruturou-se uma nova coleção com 80 isolados.

Figura 3. Dendrograma de similaridade de isolados do tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos após a amplificação do DNA por BOX-PCR com o oligonucleotídeo específico BOX-A1R. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente Dice.



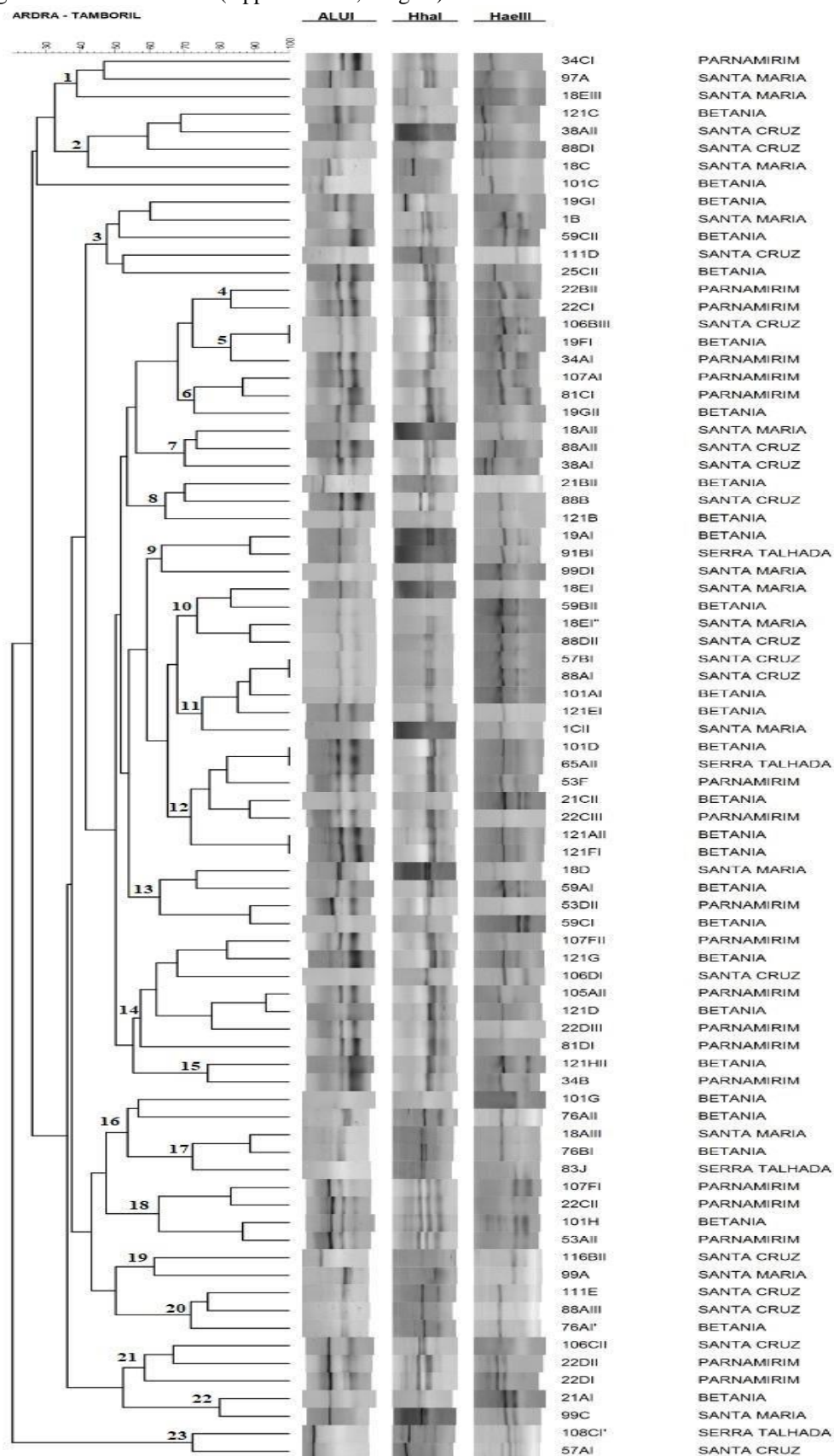
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.4 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Com os 80 isolados, a análise conjunta dos perfis de restrição a partir da amplificação do gene 16S rRNA e digestão pelas endonucleases *ALUI*, *HhaI* e *HaeIII* permitiu a formação de quatro grupos, compostos por dois isolados, com 100% de similaridade, calculado através do coeficiente de similaridade Dice, com o algoritmo UPGMA (Figura 4).

Foram formados vinte e três grupos com a similaridade variando de 35% a 85%. Com a presença da grande diversidade de isolados de diferentes solos nos grupos, foram selecionados 32 isolados para sequenciamento do gene 16S rRNA, para confirmação do posicionamento filogenético.

Figura 4. Árvore filogenética feita pelo ARDRA utilizando três enzimas *AluI*, *HhaI* e *HaeIII* obtida pelo programa BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica).



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA um total de 32 isolados foram selecionados com representantes de cada solo: Betânia (13), Parnamirim (6), Santa Cruz (5), Santa Maria da Boa Vista (4), e Serra Talhada (4). A escolha dos isolados foi realizada de acordo com a quantidade de isolados por solos e também de acordo com as seleções feitas anteriormente.

Dentre os 32 isolados foram identificadas bactérias pertencentes às subclasses α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, firmicutes e grupo de bactéria CFB - Cytophaga, Fusobacterium e Bacteróides. As 23 estirpes rizobianas foram classificadas como pertencentes aos gêneros: *Rhizobium* (17), *Agrobacterium* (3), *Bradyrhizobium*

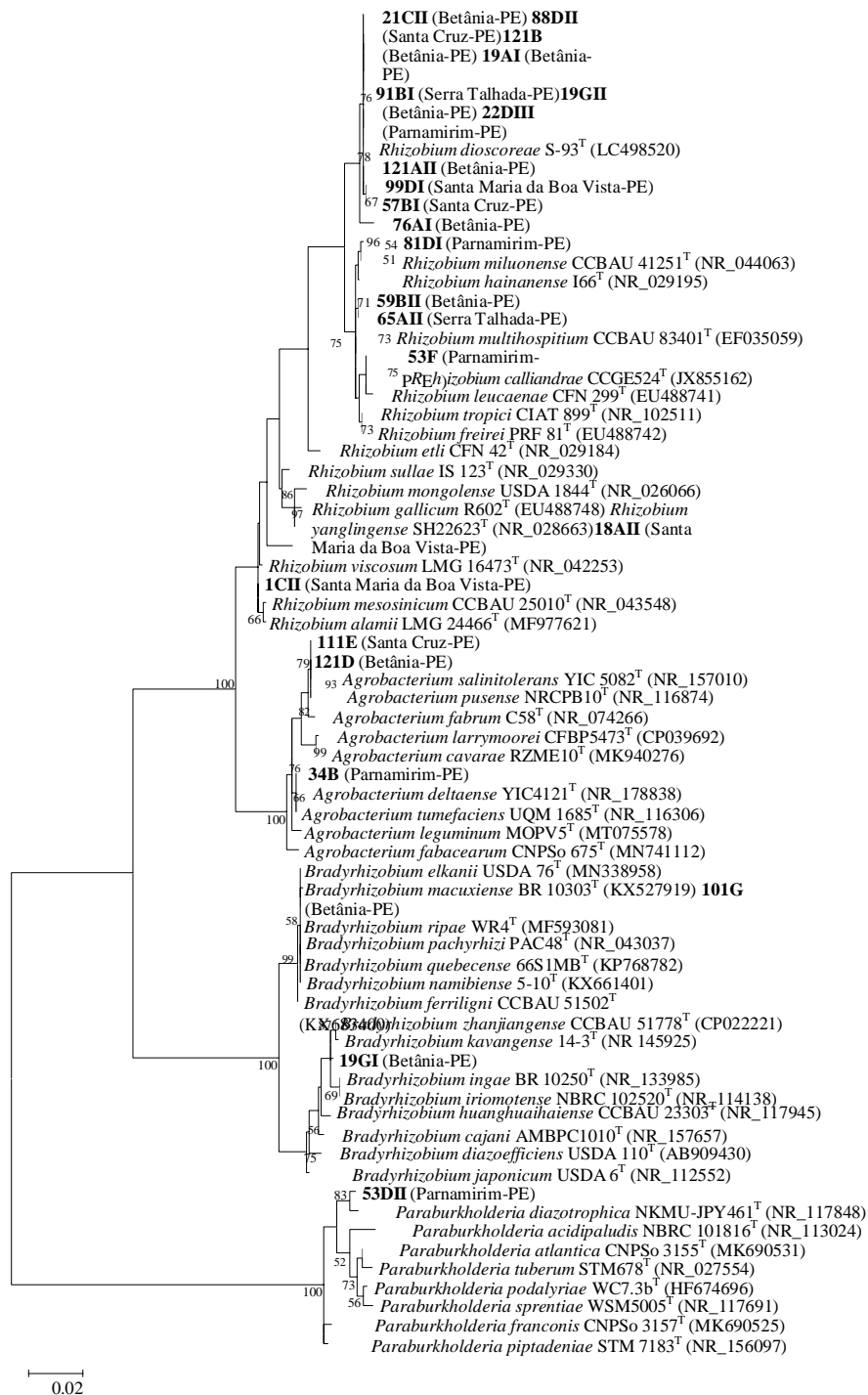
(2) e *Paraburkholderia* (1). As nove estirpes não rizobianas foram identificadas como pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas* (2), *Brucella* (2), *Pleomorphomonas* (1), *Bacillus* (1), *Siphonobacter* (1) e *Labrys* (2) (Tabela 6).

Para as estirpes rizobianas, *Rhizobium* foi o gênero de maior ocorrência, com 17 estirpes (Tabela 6). Para esse gênero, as estirpes apresentaram alta similaridade (97,49 - 100%) com as estirpes tipo de *R. dioscoreae* S-93, *R. mesosinicum* CCBAU 25010, *R. miluonense* CCBAU 41251, *R. multihospitium* CCBAU 83401 e *R. calliandrae* CCGE524.

A maioria das estirpes identificadas no gênero *Rhizobium*, 11 de 17, apresentam alta similaridade com *R. dioscoreae* S-93^T (99,09 - 100%), e estas foram encontradas em todos solos das cinco localidades analisadas. De acordo com a análise filogenética, essas onze estirpes formaram um único grupo com valor de bootstrap de 78% com *Rhizobium dioscoreae* S-93^T (Figura 5). As estirpes 59BII (Betânia) e 65AII (Serra Talhada) apresentaram alta similaridade com *R. multihospitium* CCBAU 83401^T (99,61 e 99,62%, respectivamente). As estirpes 18AII e 1CII, isoladas de solos de Santa Maria da Boa Vista, apresentaram alta similaridade com *R. mesosinicum* CCBAU 25010^T, (97,49 e 99,70%, respectivamente). As estirpes 81DI e 53F, isoladas de solos de Parnamirim, apresentaram alta similaridade com *R. miluonense* CCBAU 41251^T (99,76%), e *R. calliandrae* CCGE524^T (99,92%), respectivamente.

Três estirpes oriundas de solos distintos, 34B (Parnamirim), 121D (Betânia), e 111E (Santa Cruz), foram identificados como pertencentes ao gênero *Agrobacterium*. As estirpes 111E e 121D apresentaram alta similaridade com *A. pusense* NRCPB10^T (99,25 e 99,39%, respectivamente), e a estirpe 34B apresentou alta similaridade com *A. tumefaciens* ATCC 23308^T (100%).

Figura 5. Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene 16S rRNA de 23 estirpes de rizóbios, isoladas de nódulos radiculares de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) e 48 estirpes tipo de *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* (1291 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes- Cantor foi usado para a reconstrução filogenética.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Duas estirpes, 101G e 19GI, oriundas do solo de Betânia, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. A estirpe 101G apresentou alta similaridade com *B. elkanii* USDA 76^T (100%), e a estirpe 19GI, apresentou alta similaridade com *B. zhanjiangense* CCBAU 51778^T (99,34%).

Dentro da subclasse das β -proteobacteria, foi identificado apenas uma estirpe, 53DII, pertencente ao gênero *Paraburkholderia*. Essa estirpe foi isolada do solo de Parnamirim e apresentou alta similaridade com *P. diazotrophica* NKMU-JPY461^T (98,37%).

As nove estirpes não rizobianas, isoladas de nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*, foram identificadas em seis diferentes gêneros, *Pleomorphomonas*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Bacillus*, *Siphonobacter* e *Labrys* (Tabela 6). A estirpe 101H, isolada do solo de Betânia, apresentou a mesma similaridade (99,40%) com quatro diferentes estirpes tipo, *Bacillus acanthi* L28, *Bacillus aryabhatai* B8W22, *Bacillus megaterium* NBRC 15308 e *Bacillus zanthoxyli* 1433. As estirpes 25CII (Serra Talhada) e 34CI (Parnamirim), apresentaram alta similaridade com *Pseudomonas yamanorum* LMG 27247^T (99,34 e 99,84%, respectivamente). As estirpes 1B (Santa Maria) e 59CII (Betânia) apresentaram alta similaridade com *Brucella pseudogrignonensis* CCUG 30717^T (99,92%).

As estirpes 111D (Santa Cruz) e 59CI (Betânia), apresentaram alta similaridade, com *Labrys neptuniae* Liuja-146^T (99,55% e 99,77%, respectivamente). A estirpe 108CI (Serra Talhada), apresentou alta similaridade com *Siphonobacter aquaeclarae* P2^T (98,87%) e a estirpe 88B (Santa Cruz) apresentou alta similaridade com *Pleomorphomonas oryzae* NBRC 102288^T (99,76%).

Tabela 3. Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 32 bactérias isoladas de nódulos radiculares de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), oriundas de diferentes solos do estado de Pernambuco.

Estirpes	Duplex-PCR	Origem	Extensão (pb)	Sequências mais similares – GenBank		
				Espécie	Similaridade (%)	Nº de Acesso
111E	<i>nifH/nodC</i>	Santa Cruz	1331	<i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 ^I	99.25	NR_116874
76AI	<i>nifH</i>	Betânia	1322	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	99.09	LC498520
91BI	<i>nifH</i>	Serra Talhada	1311	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	99.16	LC498520
19AI	<i>nifH</i>	Betânia	1312	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	99.85	LC498520
18AII	<i>nifH/nodC</i>	Santa Maria da Boa Vista	1317	<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	97.49	NR_043548
1CII	<i>nifH/nodC</i>	Santa Maria da Boa Vista	1312	<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	99.70	NR_043548
121B	<i>nifH</i>	Betânia	1320	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^I	99.77	LC498520
101G	<i>nifH/nodC</i>	Betânia	1297	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76 ^I	100.00	MN338958
59BII	<i>nifH</i>	Betânia	1284	<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	99.61	NR_044053
21CII	<i>nifH</i>	Betânia	1323	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	99.92	LC498520
99DI	<i>nifH</i>	Santa Maria da Boa Vista	1326	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	99.70	LC498520
57BI	<i>nifH</i>	Santa Cruz	1312	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^I	99.47	LC498520
88DII	<i>nifH</i>	Santa Cruz	1311	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^I	99.24	LC498520
121AII	<i>nifH</i>	Betânia	1328	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^I	99.62	LC498520
65AII	<i>nifH</i>	Serra Talhada	1316	<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	99.62	NR_044053
121D	<i>nifH/nodC</i>	Betânia	1316	<i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 ^T	99.39	NR_116874
19GI	<i>nifH/nodC</i>	Betânia	1206	<i>Bradyrhizobium zhanjiangense</i> CCBAU 51778 ^T	99.34	CP022221
19GII	<i>nifH</i>	Betânia	1267	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^T	100.00	LC498520
53DII	<i>nifH/nodC</i>	Parnamirim	1287	<i>Paraburkholderia diazotrophica</i> NKMU-JPY461 ^T	98.37	NR_117848

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 3. Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 32 bactérias isoladas de nódulos radiculares de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), oriundas de diferentes solos do estado de Pernambuco.

						(Conclusão)
22DIII	<i>nifH</i>	Parnamirm	1263	<i>Rhizobium dioscoreae</i> S-93 ^I	99.76	LC498520
53F	<i>nodC</i>	Parnamirim	1281	<i>Rhizobium calliandrae</i> CCGE524 ^I	99.92	NR_109693
34B	<i>nifH/nodC</i>	Parnamirim	1289	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> UQM 1685 ^I	100.00	NR_116306
81DI	<i>nifH/nodC</i>	Parnamirim	1237	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^I	99.76	NR_044063
88B	<i>nifH</i>	Santa Cruz	1324	<i>Pleomorphomonas oryzae</i> NBRC 102288 ^I	99.40	NR_114056
25CII	<i>nifH</i>	Serra Talhada	1364	<i>Pseudomonas yamanorum</i> LMG 27247 ^T	99.34	LT629793
1B	<i>nifH</i>	Santa Maria da Boa Vista	1362	<i>Brucella pseudogrignonensis</i> CCUG 30717 ^T	99.92	NR_042589
101H	<i>nifH</i>	Betânia	1330	<i>Bacillus acanthi</i> L28 ^T	99.40	MT516450
				<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T	99.40	MK182805
				<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 ^I	99.40	CP009920
				<i>Bacillus zanthoxyli</i> 1433 ^T	99.40	MW578394
59CII	<i>nifH</i>	Betânia	1287	<i>Brucella pseudogrignonensis</i> CCUG 30717 ^T	99.92	NR_042589
34CI	<i>nifH</i>	Parnamirim	1263	<i>Pseudomonas yamanorum</i> LMG 27247 ^I	99.84	LT629793
108CI	<i>nifH</i>	Serra Talhada	1324	<i>Siphonobacter aquaeclarae</i> P2 ^T	98.87	NR_116562
111D	<i>nifH</i>	Santa Cruz	1327	<i>Labrys neptuniae</i> Liujia-146 ^I	99.55	NR_043801
59CI	<i>nifH</i>	Betânia	1326	<i>Labrys neptuniae</i> Liujia-146 ^T	99.77	NR_043801

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6 DISCUSSÃO

Foram obtidos 127 nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*. As maiores quantidades de nódulos e isolados foram nos solos de Betânia, Serra Talhada e Parnamirim. De acordo com a análise química do solo, as três localidades apresentaram altos teores de nutrientes, o que pode estar relacionado ao resultado obtido, pois os nutrientes, nitrogênio, potássio e fósforo presentes no solo afetam todas as etapas da simbiose, como a nodulação e a fixação de nitrogênio (VOUNG et al., 2017), dessa maneira, os solos de Santa Maria e Santa Cruz foram identificados com as menores quantidades de nódulos e isolados nessas regiões os valores dos nutrientes foram inferiores quando comparados aos três primeiros solos.

Em Santa Cruz, por exemplo, obtive o menor teor de cálcio ($0,70 \text{ cmolc dm}^3$), e, além dos nutrientes, esse solo apresentou o menor valor do pH (4,40) (Tabela 4). O alto teor de cálcio é necessário para a fase de encurvamento do pêlo radicular. A deficiência desse nutriente dificulta a divisão celular, afetando a formação e crescimento dos nódulos e raízes, o pH e a disponibilidade de outros elementos (VAN SCHREVEN, 1958; FRANCO e DOBEREINER, 1968; MALAVOLTA 1980; MALAVOLTA et al. 1997). O pH baixo pode limitar o desenvolvimento de rizóbios, como o *Bradyrhizobium*, por causa da sensibilidade desse gênero à acidez do solo (KAPEMBWA et al., 2016).

Apesar do potencial que espécies leguminosas arbóreas nodulíferas apresentam na incorporação de N aos solos, diversos fatores influenciam na ocorrência e eficiência de populações nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), como atributos químicos e físicos do solo, condições climáticas, histórico de uso do solo e o hospedeiro vegetal. Além disso, esses fatores também afetam o estabelecimento da simbiose e a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (SOUZA et al., 2007; LIMA et al., 2009; COSTA et al., 2014; MENEZES et al., 2015; LIRA et al., 2020).

Teixeira et al. (2006) investigaram a contribuição das BNF para a nutrição de N em camaratuba (*Cratylia mollis*). Os resultados indicaram que na estação chuvosa, *C. mollis* apresentou até 86% de N proveniente da atmosfera, enquanto na estação seca, a quantidade de N chegou a 27%, indicando um aparente efeito sazonal na eficiência da BNF. A pluviosidade tem participação fundamental no desenvolvimento bacteriano no solo, provavelmente por gerar um microambiente favorável a esses microrganismos (RODRIGUES et al., 2011).

Ao analisar a coleção dos 207 isolados via análise de Duplex-PCR, verificou-se que 93 apresentaram amplificação para um ou ambos os genes *nifH* e *nodC*. Essa redução na coleção bacteriana, pode ter ocorrido devido os nódulos de leguminosas serem habitados por isolados

não-rizobianos, no qual, são descartados durante a análise de identificação dos genes simbióticos. Além disso, a desinfestação superficial dos nódulos para o processo de isolamento das bactérias, pode ter sido ineficiente (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013; LEITE et al., 2018).

O principal objetivo quando se usa marcadores de fingerprint é identificar a diversidade de linhagens de bactérias em grandes coleções (VAN-CAUWENBERGHE et al., 2014). O BOX-PCR, por gerar fingerprint mais robusto e por produzir um padrão de fragmentos mais complexos, tem sido utilizado em estudos de diversidade de rizóbios (FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015; MENEZES et al., 2016). Com base nesta caracterização prévia, é possível selecionar representantes, a partir de grupos com perfis idênticos, para serem usados em estudos mais detalhados de filogenia.

Verificou-se que dez clusters apresentaram similaridade de 100%. Dentre esses, sete clusters foram agrupados somente com dois isolados e os outros três clusters tiveram agrupamentos com 3 isolados. O primeiro e o décimo clusters, agruparam isolados oriundos da mesma planta. Provavelmente, durante as etapas de purificação, os mesmos isolados foram repicados em placas diferentes.

O sétimo clusters apresentou dois isolados da mesma planta, com solo de Santa Maria da Boa Vista (18AI E 18BII) e o terceiro isolado pertence ao solo de Betânia (19AI). Santa Maria da Boa Vista e Betânia apresentam precipitação e temperatura anual muito similar. As condições ideais de temperatura, umidade e natureza do material em decomposição, favorecem a formação de material rico em proteína (material básico para o desenvolvimento de bactérias), predominando tipo de microrganismo específico (KENNEDY e GEWIN, 1997). Os três clusters que apresentaram maiores agrupamentos, são constituídos principalmente por isolados oriundos do mesmo solo. Ao analisar os resultados com similaridade a 100%, com uma coleção de 93 isolados, confirma-se por meio da técnica de BOX-PCR um alto grau de polimorfismo entre os isolados avaliados, resultando em alta diversidade de bactérias.

Lyra et al. (2013) avaliaram isolados de amendoim (*Arachis hypogaea*) em solos de Pernambuco por meio da técnica BOX-PCR. Dezoito dos 22 isolados não apresentaram similaridade, ao serem comparados com 19 cepas de referência (*Bradyrhizobium elkani* BR 29; *Bradyrhizobium japonicum* BR 11; *Sinorhizobium fredii* BR112; *Sinorhizobium meliloti* BR 7411; *Sinorhizobium medicae* BR 525; *Sinorhizobium saheli* BR 526; *Sinorhizobium teranga* BR 527; *Rhizobium* sp. BR 2406; *Rhizobium tropici* tipo IIA BR 10016; *Rhizobium tropici* tipo IIB BR 3220; *Rhizobium etli* BR 10026; *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli BR 10052; *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii BR 7605; *Rhizobium galegae* BR 10055;

Mesorhizobium loti BR 7801; *Mesorhizobium cicer* BR 521; *Mesorhizobium mediterraneum* BR 522; *Mesorhizobium huakuii* BR 524; *Azorhizobium caulinodans* BR5410).

Dias et al. (2021) isolaram estirpes dos nódulos de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) oriundas de solos de quatro municípios no estado de Pernambuco. Esses autores submeteram 22 isolados na análise do BOX-PCR e identificaram a ausência de clones. Esses resultados enfatizam o alto grau de variabilidade dos rizóbios presentes nos solos pernambucanos.

Ao analisar o resultado do ARDRA, evidenciou uma alta variabilidade genética entre os isolados dos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*. Estudos sobre a diversidade de rizóbios utilizando a técnica de ARDRA, tem demonstrado que os rizóbios nativos de solos do Semiárido apresentam alta variabilidade genética (SILVA, 2020; SILVA, 2021, DA SILVA, 2021). Leite et al. (2009) também verificaram grande variabilidade genética dos isolados em solos da região do Vale do São Francisco, ao utilizar a técnica de ARDRA.

De acordo com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA, o gênero *Rhizobium* apresentou a maior ocorrência, com 17 isolados. Desses, segundo a análise de duplex-PCR revelou que 13 estirpes (76AI, 91BI, 19AI, 121B, 59BII, 21CII, 99DI, 57BI, 88DII, 121AII, 65AII, 19GII e 22DIII) apresentaram amplificação para o gene *nifH*, E, onze (76AI, 91BI, 19AI, 121B, 21CII, 99DI, 57BI, 88DII, 121AII, 19GII e 22DIII) dentre os treze isolados apresentaram alta similaridade com a estirpe tipo *Rhizobium dioscoreae* S-93 e as outras estirpes (59BII e 65AII) foram similares a estirpe tipo *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401 (2).

Três estirpes (18AII, 1CII e 81DI) apresentaram amplificação para ambos os genes simbióticos (*nifH* e *nodC*) apresentando alta similaridade com as estirpes tipo *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 25010 (2) e *R. miluonense* CCBAU 41251 (1). Uma estirpe (53F) apresentou amplificação apenas para o gene *nodC* e revelou alta similaridade com a estirpe *R. calliandrae* CCGE524.

A estirpe tipo *R. dioscoreae* S-93 foi isolada de raízes de inhame de solos alcalinos pobres em nutrientes na Ilha Miyako em Okinawa-Japão. Nas análises para descrição de *R. dioscoreae* S-93T, os autores constataram por meio de um ensaio de redução de acetileno que essa espécie tem a capacidade de fixar nitrogênio. Além disso, a sua capacidade em promover o crescimento do inhame foi verificada por meio das análises de produção de hormônios, sideróforos e solubilização de fosfato inorgânico (OUYABE et al. 2020).

Rizóbios são conhecidos por serem isolados de leguminosas. Porém, estudos recentes apresentam novas espécies de *Rhizobium* isolados de amostras ambientais, como do rio de água doce em Taiwan-China (SHEU et al., 2015) e da areia do deserto em Mu Us - China

(ZHANG et al., 2017), como também em plantas não leguminosas, incluindo arroz com a espécie *Rhizobium rhizoryzae* sp. nov. (ZHANG et al., 2014; ZHAO et al., 2017), milho com *Rhizobium zea* sp. nov. (CELADOR-LERA et al., 2017), gramíneas com *Rhizobium smilacinae* sp. nov. (ZHANG et al., 2014) e inhame com *R. dioscoreae* S-93 (OUYABE et al. 2020). Em plantas não leguminosas, algumas espécies de *Rhizobium* têm sido relatadas como promotoras do crescimento vegetal. Como exemplo, a inoculação com *R. leguminosarum* na cultura do arroz que promoveu um aumento significativo na biomassa e no rendimento de grãos (SINGH et al., 2006).

Dentro do gênero *Rhizobium* outras estirpes, 18AII e 1CII, apresentaram alta similaridade com *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 25010^T. Esses dois isolados apresentaram amplificação para ambos os genes simbióticos *nifH* e *nodC*. *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 25010^T foi isolado de nódulos de três espécies de leguminosas nativas da China pertencentes aos gêneros *Albizia*, *Kummerowia* e *Dalbergia* (LIN et al., 2009). Essa estirpe apresentou amplificação do gene *nodC*, e foi capaz de nodular seus hospedeiros. Porém, ao ser inoculada em outras espécies de leguminosas (*Medicago sativa*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*) não houve nodulação.

Bopape et al. (2020) avaliaram uma estirpe de *Rhizobium tropici* e verificaram que este rizóbio tem a capacidade de formar nódulos nas raízes do guandu, mas não possui os genes de nodulação comuns (*nodABC*), com exceção do gene *noIR* que atua como fator de transcrição de ligação ao DNA, e que essa estirpe provavelmente usa outras vias para induzir nódulos na planta.

Ainda dentro do gênero *Rhizobium*, duas estirpes, 59BII (Betânia) e 65AII (Serra Talhada), apresentaram similaridade com *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401^T. Esses dois isolados na análise do duplex-PCR apresentaram gene positivo apenas para *nifH*. Han et al. (2008) ao isolarem 31 cepas de rizóbios nos nódulos de espécies leguminosas nativas China (*Lotus frondosus*, *Lotus tenuis*, *Alhagi toum*, *Astragalus aksuensis*, *Astragalus betetovii*, *Halimodendron halodendron*, *Oxytropis meinshausenii*, *Oxytropis glabra*, *Robinia pseudoacacia*, *Sophora alopecuriodes*, *Caragana jubata*, *Lathyrus odoratus* e *Vicia hirsuta*), identificaram *Rhizobium multihospitium*, como uma nova estirpe presente nos nódulos das leguminosas nativa e verificaram a presença dos genes *nifH* e *nodD*.

O gênero *Agrobacterium* foi identificado em três estirpes de solos distintos, 34B (Parnamirim), 121D (Betânia) e 111E (Santa Cruz), apresentando similaridade com as espécies *Agrobacterium tumefaciens* UQM 1685^T e *Agrobacterium pusense* NRCPB10^T. De acordo com o resultado do duplex-PCR, as três estirpes amplificaram ambos genes

simbióticos (*nifH* e *nodC*). Cavalcanti et al. (2020) identificaram esse gênero isolados em nódulos de feijão-caupi em campo em Petrolina-PE. Os autores ainda demonstraram que existe *Agrobacterium* spp. em solos agrícolas do Semiárido brasileiro capazes de colonizar endofiticamente os tecidos do milho e nodular feijão-caupi (*V. unguiculata*).

O gênero *Bradyrhizobium* é o mais frequente em estudos de isolamento e caracterização de rizóbios no Nordeste, assim como em outras regiões do país (HUNGRIA et al., 2007; SILVA, 2020; JANTALIA et al., 2021). Entretanto, no presente estudo, apenas dois isolados do gênero *Bradyrhizobium* foram identificados, ambos do solo de Betânia. Martínez Alcántara et al. (2020) isolaram e caracterizaram com base em características microbiológicas e marcadores moleculares, bactérias dos nódulos de três espécies arbóreas nativas da América do Sul, dentre elas *Enterolobium contortisiliquum*. Esses autores isolaram apenas uma estirpe de *E. contortisiliquum* e esta foi identificada como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium*.

Dentro da subclasse das β -proteobacteria o gênero *Paraburkholderia* foi encontrado na estirpe 53DII do solo de Parnamirim, com 98,37% de similaridade com a estirpe tipo *Paraburkholderia diazotrophica* NKMU-JPY461. Essa estirpe, 53DII, apresentou amplificação positiva para os dois genes simbióticos (*nifH* e *nodC*).

O gênero *Paraburkholderia* está comumente associado à leguminosas do Clado *Mimosoidae*, no qual, está inserido *Enterolobium contortisiliquum*. Nas espécies de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (MARTINS et al., 2015), surucucu (*Piptadenia viridiflora*) (BOURNAUD et al., 2013) e em outras espécies de *Mimosa* spp. no bioma Caatinga como jurema-preta (DIAS et al., 2021) e do bioma Cerrado brasileira (REIS JÚNIOR et al., 2010; SOARES NETO et al., 2022) *Paraburkholderia* é o gênero mais frequente.

Além disso, *Paraburkholderia* também foi identificada em outras leguminosas (*Papilionoideae*) como mulungu (*Erythrina velutina*) em solos de Caatinga (MENEZES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018) e em outros países como a França em dormideira (*Mimosa pudica* L.) (MISHRA et al., 2012) e em outros países tropicais, como a Venezuela nas espécies feijão-da-China (*Vigna radiata*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (RAMIREZ et al., 2020).

No presente estudo, além da ocorrência de rizóbios nos nódulos radiculares de *Enterolobium contortisiliquum*, também foi verificada a presença de diferentes gêneros de bactérias não rizobianas (*Pseudomonas* (2), *Brucella* (2), *Labrys* (2), *Pleomorphomonas* (1), *Bacillus* (1) e *Siphonobacter* (1)) e, de acordo com a análise de duplex-PCR todos os não rizobianos apresentaram apenas o gene simbiótico *nifH*.

Estudos têm observado que muitos dos isolados não-rizobianos obtidos nos processos de isolamento, são bactérias endofíticas que coabitam os nódulos com os rizóbios (COSTA et al., 2013; DHOLE et al., 2016; SANCHEZ-CAÑIZARES et al., 2017; MARTINEZ-HIDALGO e HIRSCH, 2017; LEITE et al., 2018).

Martínez Alcántara et al. (2020) avaliando três leguminosas arbóreas da Argentina (*Poecilanthe parviflora Benth*, *Vachellia caven* e *Enterolobium contortisiliquum*) identificaram, além de rizóbios, bactérias dos gêneros *Gamaproteobactéria* (*Pseudomonas*, *Dyella* e *Caulobacter*), *Actinobacteria* (*Curtobacterium* e *Micobacterium*) e *Firmicutes* (*Bacillus*). De acordo com esses autores, os nódulos são ricos em nutrientes e proporcionam um ambiente favorável não só para as BFN, mas também para outras bactérias (associativas ou endofíticas). Além disso, esses endófitos não rizobianos podem desempenhar um papel na nutrição, promovendo o crescimento e a saúde das plantas.

Espécies dos gêneros *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* e *Bacillus* são conhecidos agentes de controle biológico capazes de reduzir a incidência e severidade de doenças em diversas culturas (ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016; FIRA et al., 2018; TARIQ, 2017). No presente estudo, duas estirpes, 25CII (Serra Talhada) e 34CI (Parnamirim) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. As pesquisas voltadas para estudo da diversidade genética das bactérias endofíticas não rizobianas, podem ajudar a compreender a importância e comportamento, em conjunto com rizóbios, possibilitando identificar estirpes com potencial para utilização na agricultura como inoculantes (PEIX et al., 2015).

A estirpe 101H (Betânia) foi identificada pertencente ao gênero *Bacillus* com similaridade de 99.40% com quatro estirpes tipo desse gênero. Estudo no Semiárido pernambucano conduzido por Leite et al. (2017), corrobora com esses resultados, pois foram encontradas bactérias endofíticas não-rizobianas em nódulos de leguminosa (feijão-caupi) pertencentes a diversos gêneros, dentre eles, *Bacillus*. Costa et al. (2013) também identificaram a presença de *Bacillus* em nódulos de feijão-caupi no Cerrado Piauiense. *Bacillus* spp. é o agente de controle de patógenos com maior número de produtos comerciais em uso ao redor do mundo, também com potencial reconhecido como promotor de crescimento de plantas (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

De acordo com o sequenciamento do gene 16S rRNA a estirpe 88B (Santa Cruz) apresentou 99.40% de similaridade com a espécie *Pleomorphomonas oryzae* NBRC 102288^T. Essa espécie foi isolada das raízes de arroz no Japão e nas análises para descrição de *P. oryzae* NBRC 102288, os autores constataram, por meio de um ensaio de redução de acetileno, que essa espécie tem a capacidade de fixar nitrogênio (XIE e YOKOTA, 2005). *P.*

oryzae já foi identificada em raízes de junco (*Phragmites australis*) na China (LI et al., 2010) e também encontrada por Baraúna et al. (2014) em nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense*) no Cerrado de Roraima - Brasil. Esses autores verificaram que um isolado dessa espécie foi capaz de nodular em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), mas os genes simbióticos relacionados à nodulação não foram analisados.

Na análise de do sequenciamento parcial do 16S rRNA a estirpe 108CI (Serra Talhada) apresentou 98.87% de similaridade com a espécie *Siphonobacter aquaeclarae* P2^T. Essa estirpe foi isolada do biofilme desenvolvido na superfície interna de um sistema de água de resfriamento ultrapura em uma usina húngara (TANCSICS et al., 2010). O gênero de *Siphonobacter* já foi descrito em filosfera de milho na África do Sul (MASHIANE et al., 2017) como também em mudas de arroz na China (DU et al., 2020). Rattanapolsan et al. (2021) identificaram a espécie *Siphonobacter aquaeclarae* induzindo o crescimento de *Murdannia spectabilis* por meio da produção de AIA (ácido indol-3-acético) na Tailândia.

As estirpes 111D (Santa Cruz) e 59CI (Betânia), foram identificadas no gênero *Labrys*, e apresentaram alta similaridade com *Labrys neptuniae* Liujiia-146^T. A espécie *Labrys neptuniae* Liujiia -146^T foi isolada de nódulos radiculares da leguminosa aquática *Neptunia oleracea* em uma lagoa de água doce no sul de Taiwan, China (CHOU et al., 2007). Os autores realizaram os testes de nodulação em plantas de *N. oleracea* e *Macroptilium atropurpureum*, e observaram que não houve a formação de nódulos nas plantas colhidas aos 45 dias após a inoculação com Liujiia-146^T. No presente estudo, os dois isolados (111D e 59CI) apresentaram amplificação somente para o gene *nifH*.

Tapia-García et al. (2020), isolaram diversas bactérias em nódulos de leguminosas silvestres, no México, e verificaram uma estirpe identificada como *Labrys* sp. próxima a *L. neptuniae*. Essa estirpe foi isolada de nódulos radiculares de *Acaciella* sp. e apresentou amplificação do gene *nodC*, produção de AIA e fixação de nitrogênio como uma bactéria de vida livre. Porém, não foram utilizados testes em plantas para verificar a capacidade de nodulação e eficiência dessa estirpe.

Labrys não é amplamente reconhecida como uma bactéria com capacidade de nodulação em plantas. Porém uma estirpe identificada como *Labrys monachus* realizou simbiose efetiva com *Crotalaria spectabilis*, mas os genes simbióticos relacionados a nodulação não foram analisados (RANGEL et al., 2017).

Alguns estudos relatam a capacidade da espécie *E. contortiliquum* em se associar com as bactérias nodulíferas (FRIONI et al., 1998; JESUS et al., 2014; TRANNIN et al., 2001; MARTÍNEZ ALCÁNTARA et al., 2020). Entretanto, não se encontra na literatura

trabalhos que relatem quais as bactérias estão presentes nos nódulos do *Enterolobium contortisiliquum* na região do Semiárido pernambucano. Na Argentina um trabalho conduzido por Martinez Alcántara et al. (2020) identificou apenas a estirpe *Bradyrhizobium lianonginense* em nódulos de *Enterolobium contortisiliquum*.

No presente estudo, foi identificado pela primeira vez os gêneros rizobianos *rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* e os não rizobianos *Pleomorphomonas*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Bacillus*, *Siphonobacter* e *Labrys* nos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* isolados de nódulos radiculares de *E. contorsiliquum*, oriundos de diferentes solos do Semiárido pernambucano. A pesquisa das bactérias associadas a *E. contorsiliquum* apresenta significativa importância científica, uma vez que é fundamental compreender a dinâmica da simbiose planta- microrganismo. A capacidade dessas plantas em formar nódulos simbióticos tem sido amplamente reconhecida por proporcionar uma série de benefícios, tais como maior sobrevivência e crescimento no campo. Nesse sentido, a investigação das interações microbianas envolvidas é essencial para o avanço do conhecimento na área de microbiologia agrícola e para o desenvolvimento de técnicas aprimoradas de cultivo e produção vegetal.

7 CONCLUSÃO

Os isolados de diferentes solos pernambucano demonstraram alta variedade genética de acordo com o BOX-PCR;

Conforme o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA solos de diferentes localidades do Semiárido pernambucano, apresentam grande diversidade genética de rizóbios: *rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* e os não rizobianos: *Pleomorphomonas*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Bacillus*, *Siphonobacter* e *Labrys*;

Rhizobium é o gênero de maior ocorrência em nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* em diferentes solos do Semiárido pernambucano.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Oscar Nelson; ALLEN, Ethel K. The Leguminosae, a source book of characteristics, uses, and nodulation. **Univ of Wisconsin Press**, 1981.
- ALMEIDA, A. L. G. et al. Produtividade do feijão caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Agrária**, v.5, n.3, p.364-369, 2010.
- ALTHOFF, Tiago Diniz et al. Adaptation of the century model to simulate C and N dynamics of Caatinga dry forest before and after deforestation. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 254, p. 26-34, 2018.
- ALTSCHUL, S. E.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. I.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p.403-410, 1990.
- ANDREOTE, Fernando Dini; AZEVEDO, João Lúcio; ARAÚJO, Welington Luiz. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANDREWS, Mitchell et al. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using ^{15}N natural abundance. **Plant Ecology & Diversity**, v. 4, n. 2-3, p. 131-140, 2011.
- ARAÚJO FILHO, J. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. IICA, Brasília (Brasil) Projeto Dom Helder Camara, Recife (Brasil) Projeto SEMEAR, Brasília (Brasil) Associação Brasileira de Agroecologia, Rio Grande do Sul (Brasil), 2013.
- ARAÚJO, Andréia Parra de; PAIVA SOBRINHO, Severino de. Germinação e produção de mudas de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, v. 35, p. 581-588, 2011.
- AZARIAS GUIMARÃES, Amanda et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpeas as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6726- 6733, 2012.
- BACKES, P; IRGANG, B. Árvores do Sul: Guia de Identificação e Interesse Ecológico. Porto Alegre, RS: **Paisagem do Sul**. 2009, 332p.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; Balota, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**: Rio de Janeiro, 69:116. 1997
- BARAÚNA, Alexandre Cardoso et al. Diversity and nitrogen fixation efficiency of rhizobia isolated from nodules of *Centropogon paraense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 296-305, 2014.
- BARBOSA, Julierme Zimmer et al. Improving yield and health of legume crops via co-inoculation with rhizobia and Trichoderma: A global meta-analysis. **Applied Soil Ecology**, v.

176, p. 104493, 2022.

BARRETTO, Soraia Stéfane Barbosa; FERREIRA, Robério Anastácio. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae Mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 223-232, 2011.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, 66: 1085-1113, 2015.

BIDLACK, J. E.; RAO, S. C.; DEMEZAS, D. H. Nodulation, nitrogenase activity, and dry weight of chickpea and pigeon pea cultivars using different Bradyrhizobium strains. **Journal of Plant Nutrition**, 2001.

BONFIM, Cláudia Silva Gomes et al. Endophytic bacteria naturally inhabiting commercial maize seeds occupy different niches and are efficient plant growth-promoting agents. **Symbiosis**, v. 81, p. 255-269, 2020.

BONTEMPS, Cyril et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.

BOPAPE, F. L. et al. Draft Genome Sequence of *Rhizobium tropici* SARCC-755, a FreeLiving *Rhizobium* That Nodulated and Promoted Growth in Pigeonpea [*Cajanuscajan* (L.) Millsp.]. **Microbiology resource announcements**, v. 9, n. 2, jan. de 2020.

BOURNAUD, Caroline et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe *Mimoseae*). **PLOS One**, v. 8, n. 5, p. e63478, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União** – Seção 1., Instrução normativa no. 13 de 24 de março de 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. Acesso em: 06 mai. 2023.

CARVALHO, JULLYANNA NAIR DE; Beckmann-Cavalcante, Márkilla Zunete; RODRIGUES, RENATO GARCIA; FONTANA, ANDRÉ PAVIOTTI; PIFANO, DANIEL SALGADO. Native caatinga species for the recovery of degraded areas in the brazilian Semiarid region. **Revista Árvore**, v. 46, p. e4610, 2022.

CASTRO, ANTÔNIO SÉRGIO; CAVALCANTE, A. Flores da caatinga (Caatingaflowers). **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação–Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande-PB**, 2011.

CASTRO, Francelita Coelho; SANTOS, Antonio Marcos dos. Salinidade do solo erisco de desertificação na região semiárida. **Mercator (Fortaleza)**, v. 19, 2020.

CAVALCANTI, M. I. P. et al. Maize growth and yield promoting endophytes isolated into a

legume root nodule by a cross-over approach. **Rhizosphere**, v. 15, p. 100211, 2020.

CELADOR-LERA, L; MENÉNDEZ, E; PEIX A; IGUAL, J.M; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium zea* sp. nov., isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.). **Int J Syst Evol Microbiol**; 67: 2306 – 2311, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.001944

CGEE-CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Desertificação, degradação da terra e secas no Brasil**. Brasília, DF: 2016. 252p. Disponível em: <<https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/DesertificacaoWeb.pdf>>. Acesso em: 17 de jul. de 2022.

CHAER, Guilherme Montandon et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011.

CHOU, Yi-Ju et al. *Labrys neptuniae* sp. nov., isolated from root nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*, **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, p. 577-581, 2007. DOI: 10.1099/ijse.0.64553-0

CIAMPITTI, Ignacio A.; SALVAGIOTTI, Fernando. New insights into soybean biological nitrogen fixation. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1185-1196, 2018.

COELHO, Katia Pereira et al. Symbiosis of rhizobia with *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.

CORREIA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. 707p.

COSTA, E. M. et al. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. porcepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p.1-7, 2011

COSTA, E. M. et al. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014. DOI: 10.5039/agraria. v9 i 4a3590.

COSTA, E. M., Nóbrega, R. S. A., Carvalho, F., Trochmann, A., Ferreira, L. V. M., Moreira, F. M. S. **Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi**. UFL, Lavras, p. 10, 2013.

COSTA, J. A. S.; NUNES, T. S.; FERREIRA, P. L.; STRADMANNE, M. T. S.; QUEIROZ, L. P. **Leguminosas forrageira da caatinga: espécies importantes para comunidades rurais no sertão da Bahia**, Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, SASOP, 2002, 112p

COSTA, José Nicola Martorano Neves da; DURIGAN, Giselda. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (*Fabaceae*): invasora ou ruderal?. **Revista Árvore**, v. 34, p. 825-833, 2010.

DA COSTA, E. M. et al. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 489–494, dez. de 2014.

- DA SILVA, Aleksandro Ferreira et al. Biological nitrogen fixation in tropical dryforests with different legume diversity and abundance. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 107, p. 321-334, 2017
- DA SILVA, Geovane Damaceno. **Biodiversidade de rizóbios nativos de solos do Semiárido de pernambuco nodulantes do mulungu (*Erythrina velutina* willd)**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2021
- DA SILVA, Vinicius Santos Gomes et al. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 3966-3974, 2016.
- DE MEYER, Sofie E. et al. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p.1-11, 2015.
- DE MUÑIZ, Graciela Ines Bolzon; MARCHIORI, José Newton Cardoso. Anatomia da madeira de duas Leguminosas Mimosoídeas da Floresta Estacional de Misiones– Argentina. **Balduinia**, n. 17, p. 23-28, 2009.
- DE SOUSA, Aleksandro Jânio Jacinto; SOBRINHO, Antonio Izidro. A importância do reflorestamento nos processos de recuperação das áreas degradadas do sertão paraibano. **REVISTA BRASILEIRA DE MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE-REBEMAS**, v. 1, n. 1, p. 14-20, 2016.
- DHOLE, A.; SHELAT, H.; VYAS, R.; JHALA, Y.; BHANGE, M. Endophytic occupation of legume root nodules by *nifH*-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Microbiology**, v. 66, 1397–1407, 2016.
- DIAS, M. A. M.; BOMFIM, C. S. G.; RODRIGUES, D. R.; DA SILVA, A. F. SANTOS, J. C. S.; DO NASCIMENTO T. R.; MARTINS L. M. V.; DANTAS, B. F.; RIBEIRO, P. R. A.; DE FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. *Paraburkholderia* spp. are the main rhizobial microsymbionts of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. in soils of the Brazilian tropical dry forests (Caatinga biome). **Syst Appl Microbiol**. 2021 May;44(3):126208. doi: 10.1016/j.syapm.2021.126208. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33992956.
- DIAS, Marcos André Moura et al. *Paraburkholderia* spp. are the main rhizobial microsymbionts of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. in soils of the Brazilian tropical dryforests (Caatinga biome). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 126208, 2021.
- DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, José; OKON, Yaacov. Plant growth- promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DOBEREINER, J; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **R. Econ. Rural**, 18:447-460, 1980.
- DOS SANTOS BRANCO, Jaisson; JÚNIOR, Paulo Prates. Fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável de forragem. **Revista Edutec**, v. 3, n. 1, 2022.

DRUMOND, M. A.; MORGADO, L. B.; RIBASKI, J. ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO FILHO, O. M. Contribuição da Embrapa Semiárido para o desenvolvimento dos sistemas agroflorestais no Semiárido brasileiro. **Agrossilvicultura**, Viçosa, v. 1, n. 2, p. 145-153, 2004.

DU, JUNJIE et al. Graphene oxide enters the rice roots and disturbs the endophytic bacterial communities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110304, 2020.

DUQUE, F. F. et al. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using 15 N. **Plant and Soil**, v. 88, p.333-343, 1985.

ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – **Review and future prospects Biological Control**. Academic Press Inc., dez. 2016.

ELLIOTT, G.N. et al. *Burkholderia phyatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, p.168–180. 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Manual de métodos de análise de solo. 2ed. Rio de Janeiro: **EMBRAPA**. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo, 1997. 212p.

EMBRAPA AGROSSILVIPASTORIL. **Primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma Agropecuária Sustentável**. Brasília, 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/200291/1/2019-cpamt-agrossilvipastorilpart-1-cap-9-fixacao-biologica-nitrogeniogramineas-leguminosas-mato-grosso-p-80-84.pdf>>. Acesso em: 13 de jan. de 2023.

ESPINDOLA, José Antonio Azevedo et al. Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 415-420, 2006.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. **Biological nitrogen fixation**. New York: **Chapman and Hall**, p. 1-42, 1992.

FAUERHARMEL, M. **Crescimento inicial de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong em diferentes substratos e lâminas de irrigação** [Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2014.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al. Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes nifH e nodC em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2013.

FERNANDES, Márcia Rodrigues de Moura; NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão; FERNANDES, Milton Marques; SOUSA, Waldeídes Castro e; FILHO, José Ferreira Lustosa. Substrates and inoculation with *Bradyrhizobium* growth of tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) degraded area. **Revista Agrarian**. ISSN: 1984-2538, p. 1-9, 2017.

FERNANDES, Moabe F.; CARDOSO, Domingos; DE QUEIROZ, Luciano P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high

species richness and endemism. **Journal of Arid environments**, v. 174, p.104079, 2020.

FERNANDES, Moabe Ferreira; QUEIROZ, Luciano Paganucci de. Vegetação e florada Caatinga. **Ciência e cultura**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, v. 285, p. 44–55, nov. 2018.

FRACETTO, Felipe José Cury; FRACETTO, Giselle Gomes Monteiro; BARROS, Felipe Martins do Rêgo; JUNIOR, Mario de Andrade Lira; NETO, Marcos Siqueira. Free-living diazotrophs drive castor bean nitrogen input in tropical semiarid soils. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, 1968.

FRANCO, Avílio A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York: **McGraw Hill**, 1928. 145p.

FREITAS, A. D. et al. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African journal of microbiology research**. 8.788. 2014.

FREITAS, A. D. S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semiarid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010.

FREITAS, A. D. S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semiarid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010.

FREITAS, A. D. S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia [em linea]** 2007, 66.

FRIONI, Lillian et al. An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v. 7, n. 3, p. 271-279, 1998.

GLICK, Bernard R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

GLICK, Bernard R.; GLICK, Bernard R. Introduction to plant growth-promoting bacteria. **Beneficial plant-bacterial interactions**. p. 1-37, 2020.

GOYAL, Ravinder K.; SCHMIDT, Maria Augusta; HYNES, Michael F. Molecular biology in the improvement of biological nitrogen fixation by rhizobia and extending the scope to cereals. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 125, 2021.

GUEFRACHI, I. et al. Assessing genotypic diversity and symbiotic efficiency of five rhizobial legume interactions under cadmium stress for soil phytoremediation. **International Journal of**

Phytoremediation, v. 15, n. 10, p. 938-951, 2013.

GUSMÃO, L. F. P. et al. Caatinga: Diversidade na adversidade do Semiárido brasileiro. **Conhecendo a biodiversidade. Brasília, MCTIC/CNPq/PPBio**, p. 101-111, 2016.

HAN, Tian Xu et al. Rhizobium multihospitium sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1693-1699, 2008.

HARDY, R_ WF et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant physiology**, v. 43, n. 8, p. 1185-1207, 1968.

HERENDEEN, Patrick S. The fossil history of the Leguminosae: phylogenetic and biogeographic implications. In: **Advances in legume systematics, part 4. The fossil record**. Royal Botanic Gardens, 1992. p. 303-316.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin**, v. 98, p. 59-78, 1904.

HILY-BLANT, Pierre et al. Nitrogen hydrides in the cold envelope of IRAS 16293-2422. **Astronomy & Astrophysics**, v. 521, p. L52, 2010.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v.86, n.4, p.927-939, 2006.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. v.2. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1009-1023

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and *azospirilla*: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, n.7, p.791-801, 2013. DOI: 10.1007/s00374-012-0771-5

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Programa de Monitoramento do Desmatamento por Satélite**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inpe/pt-br/assuntos/ultimas-noticias/copy_of_NotaTcnicaPRODESBR.pdf>. Acesso em: 25 mar 2023.

JANTALIA, C. P.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E. **Soja inoculada com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* spp. em áreas comerciais dos estados do Tocantins e Bahia: efeito na contribuição da FBNe na produtividade de grãos**. Seropédica-RJ: Embrapa agrobiologia, 2021.

JESUS, Antonieta A. et al. Quality of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.

seedlings in function of inoculation and natural nodulation in soils from southwest of Piauí, Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 198-205, 2014.

KAMST, Eric et al. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 7, p. 2103-2108, 1997.

KAPEMBWA, R.; MWEETWA, A. M.; NGULUBE, M.; YENGWE, J. Morphological and biochemical characterization of soybean nodulating rhizobia indigenous to Zambia. **Sustainable Agriculture Research**, v. 5, p. 84-96, 2016.

KENNEDY, A.C.; GEWIN, V.L. Soil microbial diversity: present and future considerations. **Soil Science**, v.162, p.607-617, 1997.

KIILL, Lúcia Helena Piedade; TERAPO, Daniel; ALVAREZ, Ivan André. **Plantas ornamentais da Caatinga**. Brasília, DF: Embrapa, 2013., 2013.

KUMAR S.; STECHER G.; Li M., KNYAZ C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549, 2018.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de cepas de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v.51, n.293, p.67-82, 2004.

LAGUERRE, G. et al. Classification of rhizobia based on nodC and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. **Microbiology**, v.147, n.4, p.981-993, 2001.

LEAL, Inara Roberta. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária UFPE, 2003.

LEAL, Paula V. et al. Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle. **Toxicon**, v. 131, p. 6-10, 2017.

LEITE, J. et al. Biodiversity of Rhizobia Associated With Cowpea Cultivars in Soils of the Lower Half of the São. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1215–1226, 2009.

LEITE, J. et al. Cowpea nodules harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. **Frontiers**, v. 7, n. January, p. 1–11, 2017

LEITE, J. et al. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, n. 4, p. 703–713, 2018.

LEITE, Jakson. **Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos**. 2015, 75 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2015.

LEITE, Tiago de Sousa et al. Produção de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* e partição de assimilados em resposta à adubação fosfatada e inoculação com fungos micorrízicos. **Ciência Florestal**, v. 27, p. 1157-1166, 2017.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes do Mundo. Kew: Jardim Botânico Real. 577, 2005

LEWIS, G.P; Rico Arce, L. Tribe Ingeae. **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, 2005. p. 193-213.

LI, Yan Hong et al. Endophytic bacterial diversity in roots of *Phragmites australis* in constructed Beijing Cuihu Wetland (China). **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 84-93, 2010.

LIMA et al. *Fabaceae* in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1, p. 127-145, 2009. DOI:10.1007/s11104-008-9855-2.

LIMA, H. C de et al. *Fabaceae* in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2013.

LIMA, R. C. C. et al. Sistema de avaliação espacial do processo de desertificação no Semiárido brasileiro. **Revista Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, p. 690-707, 2016.

LIN, Dong Xu; CHEN, Wen Feng; WANG, Feng Qin; HU, Dong; WANG, Em Tao; SUI, Xin Hua; CHEN, Wen Xin. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59, 1919–1923, 2009. DOI: 10.1099/ijs.0.006387-0

LINDSTRÖM, Kristina; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314-1335, 2020.

LIRA, T. P. et al. Diversidade e eficiência simbiótica de rizóbios de solos de clima Semiárido tropical com diferentes fertilidades. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2020.

LIU, Cheng-Wu; MURRAY, Jeremy D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. **Plants**, v. 5, n. 3, p. 33, 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 384p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2016. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384 p.

- LYRA M. C. C. P.; FREITAS A. D. S.; SILVA T. A.; SANTOS C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **Afr. J. Biotechnol.** v12, p.2147-2156,2013.
- MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 2ª ed. Fortaleza: **Printcola Gráfica e Editora** p. 413, 2012.
- MALAVOLTA, E. Elementos da nutrição mineral de plantas. São Paulo: **Ceres**, 1980.
- MALAVOLTA, E. et al. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: **Potafos**, 1997.
- MAPBIOMAS. **Relatório Anual do Desmatamento 2021**. 2022. São Paulo, Brasil
MapBiomas, 2022 - 126 páginas. Disponível em: <<https://alerta.mapbiomas.org/relatorio>>. Acesso em: 25 mar 2023.
- MARTINEZ ALCANTARA, V.; MEDINA, R.; GAUNA, J. M.; BALATTI, P. A. Bacterial endophytes diversity of tree legumes from Argentina. *Agrociencia Uruguay*. vol.24, n. spe2, e411. ISSN 1510-0839, 2020. DOI: 10.31285/AGRO.24.411
- MARTINEZ-HIDALGO, Pilar; HIRSCH, Ann. M. The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone, **Phytobiomes Journal**, v. 1, n. 2, p. 70 – 82, 2017. DOI: 10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW
- MARTINS, Paulo Geovani Silva et al. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 3, p.459-469, 2015.
- MARTINS, Sebastião Venâncio. Recuperação de áreas degradadas: ações em áreas de preservação permanente, voçorocas, taludes rodoviários e de mineração. **Viçosa: Aprenda Fácil**, 2009.
- MARTINS, Tatiana Parreiras; RANIERI, Victor Eduardo Lima. Agroforestry as an alternative to legal reserves. **Ambiente & Sociedade**, v. 17, p. 79-96, 2014.
- MARTIUS, K. P. von A viagem de Von Martius: tabulae physiognice: 1840. v. 1. **Rio de Janeiro: Index**, 1996.
- MASHIANE, Ramadimetja A. et al. Metagenomic analyses of bacterial endophytes associated with the phyllosphere of a Bt maize cultivar and its isogenic parental line from South Africa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-12, 2017.
- MEDINSKI, T.; FREESE, D. Soil carbon stabilization and turnover at alley-cropping systems, Eastern Germany. In: **EGU General Assembly Conference Abstracts**. 2012.p. 9532.
- MENEZES, K. A. S. et al. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the Caatinga dry forest (Northeastern Brazil). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 222–233, 2016.

MENEZES, K. A. S. et al. Seedling development of nodulating and nonnodulating native legumes in soils from Brazilian Caatinga biome. **Plant Science Today**, v. 2, n. 2, p. 56-59, 2015. DOI: 10.14719/pst.2015.2.2.97.

MENEZES, Kelly Aleksandra Souza et al. Genetic variability and symbiotic efficiency of *Erythrina velutina* Willd. Root nodule bacteria from the Semi-arid region in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

MENG, Cheng; TIAN, Dashuan; ZENG, Hui; YI, Chuixiang; NIU, Shuli. Global soil acidification impacts on belowground processes. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 7, p. 074003, 2019. DOI: 10.1088/1748-9326/ab239c.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 873-883, 2001.

MILNITSKY, F.; FRIONI, L.; AGIUS, F. Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 989-992, 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00214-3.

MISHRA, Ravi PN et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Paraburkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.

MISHRA, Rupesh Kumar et al. BOX-PCR and ERIC-PCR-based genotyping and phylogenetic correlation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with wilt disease in *Psidium guajava* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 2015.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza; DE CARVALHO, Teotonio Soares; SIQUEIRA, José Oswaldo. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 771-779, 2010.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica**. Editora UFLA, 2006.

MORIM, M.P.; MESQUITA, A.L.; BONADEU, F. *Enterolobium* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83154>>. Acesso em: 23 de jan. de 2023.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature** 411, 948–950, 2001. DOI: 10.1038/35082070.

MOURA, Emanuel G. et al. Diversity of Rhizobia and importance of their interactions with legume trees for feasibility and sustainability of the tropical agrosystems. **Diversity**, v. 12, n. 5, p. 206, 2020.

NASCIMENTO, L. S. R. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

NOVAIS, R. F. et al. (Ed.) **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2007. 1017 p. OLIVEIRA-FILHO, A.T.; VILELA, E.D.A.; CARVALHO, D.D.; GAVILANES, M.L. **Estudos Florísticos e Fitossociológicos em Remanescentes de Matas Ciliares do Alto e Médio Rio Grande Belo Horizonte**: Boletim técnico, v. 11, 1995.

OREN, Aharon; GARRITY, George M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 005056, 2021.

ORMENO-ORRILLO, Ernesto et al. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 287-291, 2015.

OUYABE, M.; TANAKA, N.; SHIWA, Y.; FUJITA, N.; KIKUNO, H.; BABIL, P.; SHIWACHI, H. *Rhizobium dioscoreae* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from yam (*Dioscorea species*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 70: p. 5054– 5062, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004381

PATEL, Janki K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, v. 417, p. 99-116, 2017.

PATREZE, Camila M; CORDEIRO, Lázara. Nodulation, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of some legumes native from Brazil. **Acta Botânica Brasilica**. 19(3): 527-537. 2005.

PAULA, C. A. A. et al. *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decrease in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein focal adhesion Kinase (FAK) signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 170-182, 2012.

PAULA, Ranieri R. et al. Nitrogen fixation rate of *Acacia mangium* Wild at mid rotation in Brazil is higher in mixed plantations with *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden than in monocultures. **Annals of Forest Science**, v. 75, n. 1, p. 1-14, 2018.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMARD, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015. DOI: 10.1080/07352689.2014.897899.

PEIXOTO NETO, PA de S.; AZEVEDO, João Lúcio; ARAÚJO, WL de. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREYRA, Gabriela; HARTMANN, Henrik; MICHALZIK, Ziegler Waldemar; TRUMBORE, Susan. Influence of rhizobia inoculation on biomass gain and tissue nitrogen content of *Leucaena leucocephala* seedlings under drought. **Forests**, v. 6, n. 10, p. 3686-3703, 2015.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, n.3, p.95-103, 2001.

PRADO, D. E. **As Caatingas da América do Sul**. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.(Eds.) Ecologia e Conservação da Caatinga. Editora Universitário: UFPE. 2003.

RAMIREZ, M. D. A. et al. Phylogenetic analysis of symbiotic bacteria associated with two *Vigna* species under different agro-ecological conditions in Venezuela. **Microbes and Environments**, v. 35, n. 1, p. 1–13, 2020.

RANGEL, W.D.M; LONGATTI, S.M. de Oliveira; FERREIRA, P.A.A.; BONALDI, D.S; GUIMARAES, A.A.; THIJS, S.; WEYES, N.; VANGROSVELD, J.; MOREIRA, F. M. Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. **Int. J. Phytoremediation**, V. 19, p.925-936, 2017.

RANGEL, Wesley de Melo et al. Phytoprotective effect of arbuscular mycorrhizal fungi species against arsenic toxicity in tropical leguminous species. **International Journal of Phytoremediation**, v. 16, n. 7-8, p. 840-858, 2014.

RASHID, Md Harun-or et al. Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 2, p. 98-109, 2012.

RATTANAPOLSAN, Ladawan; NAKBANPOTE, Woranan; SANGDEE, Aphidech. Zinc- and cadmium-tolerant endophytic bacteria from *Murdannia spectabilis* (Kurz) Faden. studied for plant growth-promoting properties, in vitro inoculation, and antagonism. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1131-1148, 2021.

REFATI, Daiana Caroline et al. A desertificação no Seridó do Rio Grande do Norte e da Paraíba: questão fundiária, pobreza rural e analfabetismo. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 55, 2020.

REIS JÚNIOR, FB dos et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytol**, v. 186, p. 934-946, 2010.

REIS, Veronica Massena; TEIXEIRA, KR dos S. Fixação biológica de nitrogênio- estado da arte. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 28, p. 350-68, 2005.

RODRIGUES, D. R. et al. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–10,

2018.

RODRIGUES, Dalila Ribeiro et al. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 503-512, 2018.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesq Agropec. Bras.** V. 41, n. 2, p. 275 –284, 2006

RODRIGUES, Tatiane Maria; MACHADO, Silvia Rodrigues. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 709-720, 2006.

ROUWS, Luc Felicianus Marie et al. Endophytic *radrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental microbiology reports**, v. 6, n. 4, p. 354-363, 2014.

RUFINI, M. et al. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 197–206, 2014.

SALA, Valeria Marino Rodrigues et al. Interaction of new diazotrophic endophytic bacteria and nitrogen fertilization on wheat crop under field conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1099-1106, 2008.

SALEEM, Muhammad et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 635-648, 2007.

SAMPAIO, E.V.S.; PAREYN, F.G.C. FIGUEIROA, J.M.; SANTOS JUNIOR, A.G. (Eds.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste/MMA. 2005. 331p.

SANCHEZ-CAÑIZARES, Carmen; JORRIN, Beatriz; POOLE, Philip S; TKACZ, Andrzej. Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome, **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 188 – 196, 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2017.07.001

SANTACHIARA, Gabriel et al. Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. **Plant and Soil**, v. 418, p. 191-203, 2017.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **Amb Express**, v. 9, p. 1-22, 2019.

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Unidade de Coordenação do Projeto de Recuperação das Matas Ciliares. **Restauração ecológica [recurso eletrônico]: sistemas de nucleação**. Editores: Daniela Petenon Kuntschik, Marina Eduarte, Renato Soares Armelin. Redação: Cristina Silva Sant’Anna, Deisy Regina Tres, Ademir Reis. Reimpressão da 1. ed.

São Paulo: SMA; 2011. 63 p.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v.5, article 429, Dec. 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00429.

SCUDELETTI, Daniele; CRUSCIOL, Carlos Alexandre Costa; MOMESSO, Letusa; BOSSOLANI, João William; MORETTI, Luiz Gustavo; DE OLIVEIRA, Elisa Fidêncio; TUBAÑA, Brenda Servaz; SILVA, Marcelo De Almeida; DE CASTRO, Sérgio Gustavo Quassi; HUNGRIA, Mariangela. Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. **European Journal Of Agronomy**, v. 144, p. 126749, 2023.

SEIDO, S. L.; SOUSA, L. P.; SILVA, M. J.; DONZELI, V. P.; QUEIROZ, S. O. P. Melon growth-promoting rhizobacteria under saline stress. **Rev Bras Ciências Agrárias** 14:1–9, 2019.

SEIDO, Sirando Lima et al. Genetic analysis for biological nitrogen fixation (BNF) in cowpea. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 11, p. 1764-1769, 2019.

SENA, Pâmella Thalita Souza et al. Molecular, physiological, and symbiotic characterization of cowpea rhizobia from soils under different agricultural systems in the semiarid region of Brazil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p.1178-1192, 2020.

SERAFIM FILHO, Gilvan Lopes. **Composição florística e fitossociologia de duas áreas de caatinga no parque nacional do catimbau, Buíque, Pernambuco, Brasil.** 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446–459, maio 2017.

SHAMSELDIN, Abdelaal. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation—review. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 84-94, 2013.

SHEU, S-Y; HUANG, H-W; YOUNG, C-C; CHEN, W-M. *Rhizobium alvei* sp. nov., isolated from a freshwater river. **Int J Syst Evol Microbiol.** 65:472–478, 2015. DOI: 10.1099/ijs.0.065706-0

SILVA, Ademilson Jesus; FERNANDES, Milton Marques; OLIVEIRA, Cassandra Mendonça; OLIVEIRA, Deniver Dehuel Souza; SANTOS, Breno Correia Cruz; FERNANDES, Márcia Rodrigues de Moura. Desenvolvimento de *Enterolobium contortisiliquum* e *Mimosa caesalpinifolia* inoculadas com *Azospirillum brasilense* em área degradada por mineração. **Acta Biológica Catarinense**, [S. l.], p. 7, 2021.

SILVA, Júlia Leticia et al. Diversity of arthropods on *Acacia mangium* (Fabaceae) and production of this plant with dehydrated sewage sludge in degraded area. **Royal Society Open**

Science, v. 7, n. 2, p. 191196, 2020.

SILVA, R. F. et al. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong Cultivadas em Solo Contaminado com Cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, p. 105-112, 2011.

SILVA, Raíra Carine Santana. **Diversidade genética de rizóbios de cunhã (*clitoriaternatea*) em solos do Semiárido brasileiro**. 2021. 42 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2021

SILVA, V. B.; SILVA, A. F.; SILVA, T. R.; SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F.; SOUZA, A. P.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Fast and efficient symbiotic gene-based duplex PCR approach for the preliminary selection of legumeroot nodule bacteria. **Rhizosphere, Saskatoon**, v. 10, p. 1-4, 2019. DOI: 10.1016/j.rhisph.2019.100144

SILVA, Valéria Borges da. **Micro-organismos colonizadores de nódulos de vignaspp. cultivadas em solos de caatinga**. Tese (Doutorado em Ciência do solo) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, p. 26. 2020.

SINGH, R. K.; SINGH, V.; VIVEKANANDA, M.; KRISHI, P.; SANSTHAN, A.; MEENA, R. K. Can we use Maize (*Zea mays*) Rhizobacteria as Plant Growth Promoter. **International journal of plant research**, Chicago, v. 28, n.1, p. 86-99, 2018.

SINGH, Ramesh K. et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, v. 52, p. 345-349, 2006.

SIQUEIRA FILHO, José Alves. **Flora das Caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação**. Andrea Jakobsson Estúdio, 2012.

SOARES NETO, Clemente Batista et al. *Paraburkholderia atlantica* is the main rhizobial symbiont of *Mimosa* spp. in ultramafic soils in the Brazilian Cerrado biome. **Plant and Soil**, p. 1-15, 2022.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.5, p.795-802, 2006.

SOARES, P.G.; RODRIGUES, R.R. Semeadura direta de leguminosas florestais: efeito da inoculação com rizóbio na emergência de plântulas e crescimento inicial no campo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.36, p.115-121, 2008.

SOUSA, Waldeídes Castro et al. Fontes de nitrogênio e caule decomposto de *Mauritia flexuosa* na nodulação e crescimento de *Enterolobium contortisiliquum*. **Revista Árvore**, v. 37, p. 969-979, 2013.

SOUZA, L. A. G. et al. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2007. DOI:

10.1590/S0100-204X2007000200009

SPRENT, Janet I.; PARSONS, Richard. Nitrogen fixation in legume and non-legumetrees. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 183-196, 2000

SPRENT, Janet Irene. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 401-407, 1995.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, P. V.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p. 1107-1120, 2008.

TANCSICS, Andras et al. *Siphonobacter aquaeclarae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family 'Flexibacteraceae', phylum Bacteroidetes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 11, p. 2567-2571, 2010.

TAPIA GARCÍA, Erika Yanet; TREJO, Verónica Hernández; LUNA, Joseph Guevara; ROJAS, Fernando Uriel Rojas; Herrera, Ivan Arroyo, RADILLA, Georgina Meza; MURRIETA, María Soledad Vásquez; SANTOS, Paulina Estrada-de los. Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of *Phaseolus vulgaris* L. trap plants in central and southern Mexico, **Microbiological Research**, v. 239, 2020, 126522, ISSN 0944-5013. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126522.

TARIQ, M. Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 1, n. 1, p. 038–043, 2017.

TEIXEIRA, F. C. P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M. Quantificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para *Cratylia mollis* usando a técnica de abundância natural de ¹⁵N na Caatinga Semiárida do Brasil. **Bio do Solo**. **Bioquim.** 38, 1989–1993, 2006. DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.11.013

TEIXEIRA, Fernanda CP et al. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the ¹⁵N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1989-1993, 2006.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, FM de S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 743-753, 2001.

VAN SCHREVEN, D. A. Some factors affecting the uptake of nitrogen by legumes, ja. Ia Illallaworth, E. G. (ed.). **Nutrition of the legumes**. Academia Press, New York, p. 137-164, 1958.

VAN-CAUWENBERGHE, JANNICK et al. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. **Systematic and applied microbiology**, v. 37, n. 8, p. 613-621, 2014.

VARGAS, L.; CARVALHO, T.L.G. de; FERREIRA, P.C.G.; BALDANI, V.L.D.;

BALDANI, J.I.; HEMERLY, A.S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, **Oxford**, 164p, 1970.

VITOUSEK, Peter M. et al. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, p. 20130119, 2013.

VOLTOLINI, T. V. et al. Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido. **Embrapa Semiárido-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2019.

VOUNG, H. B.; THRALL, P. H.; BARRETT, L. G. Host species and environmental variation can influence rhizobial community composition. **Journal of Ecology**, v. 105, p. 540-548, 2017.

XIE, Cheng-Hui; YOKOTA, Akira. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1233-1237, 2005.

YANG, Jun et al. Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 2, p. 244-267, 2022.

YANG, Jungwook; KLOEPPER, Joseph W.; RYU, Choong-Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in plant science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

ZAPPI, Daniela C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

ZHANG, L; SHI, X; SI, M; LI, C; ZHU, L. *Rhizobium smilacinae* sp. nov., uma bactéria endofítica isolada da folha de *Smilacina japônica*. **Antonie van Leeuwenhoek**;106: 715–723, 2014.

ZHANG, S; YANG, S; CHEN, W; CHEN, Y; ZHANG, M. *Rhizobium arenae* sp. nov., isolado da areia do deserto de Mu Us, China. **Int J Syst Evol Microbiol**; 67:2098– 2103, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.001810

ZHANG, X-X; TANG, X; SHEIRDIL, RA; SUN, L; MA, X-T. *Rhizobium rhizoryzae* sp. nov., isolado de raízes de arroz. **Int J Syst Evol Microbiol**; 64: 1373–1377, 2014. DOI: 10.1099/ijms.0.056325-0

ZHAO, J-J; ZHANG, J; SUN, L; ZHANG, R-J; ZHANG, C-W. *Rhizobium oryziradicis* sp. nov., isolado de raízes de arroz. **Int J Syst Evol Microbiol**; 67: 963–968, 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.001724