



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO

MARCOS ANDRÉ MOURA DIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, MOLECULAR E SIMBIÓTICA
DE BACTÉRIAS NATIVAS DO SEMIÁRIDO ISOLADAS DE
NÓDULOS DE ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (Sw.) DC] E JUREMA
PRETA [*Mimosa tenuiflora* (Willd.)].

PETROLINA-PE

2018

MARCOS ANDRÉ MOURA DIAS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, MOLECULAR E SIMBIÓTICA
DE BACTÉRIAS NATIVAS DO SEMIÁRIDO ISOLADAS DE
NÓDULOS DE ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (Sw.) DC] E JUREMA
PRETA [*Mimosa tenuiflora* (Willd.)].**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Área de Concentração: Produtos Bioativos do Semiárido

Linha de Pesquisa: Química e Atividade Biológica

Orientador: D.Sc. Paulo Ivan Fernandes Junior

PETROLINA-PE

2018

D541c Dias, Marcos André Moura.
Caracterização fenotípica, molecular e simbiótica de bactérias nativas do semiárido isoladas de nódulos de *algaroba* [*Prosopis juliflora* (Sw.) DC] e jurema preta [*Mimosa tenuiflora* (Wild.)] / Marcos André Moura Dias. -- Petrolina, 2018.
f. ; 29cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Recurso Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Sede, Petrolina, 2018.

Orientador: Prof. D..Sc. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

1. Bactérias - algaroba. 2. Bactérias – jurema preta. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio. 4. Biodiversidade. 5. Caatinga. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 632.32

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCOS ANDRÉ MOURA DIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, MOLECULAR E SIMBIÓTICA
DE BACTÉRIAS NATIVAS DO SEMIÁRIDO ISOLADAS DE
NÓDULOS DE ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (Sw.) DC] E
JUREMA PRETA [*Mimosa tenuiflora* (Willd.)].

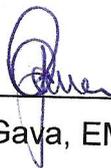
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de mestre em Recursos Naturais do Semiárido. Linha de pesquisa: Química e Atividade Biológica.

Aprovada em 30 de agosto de 2018.

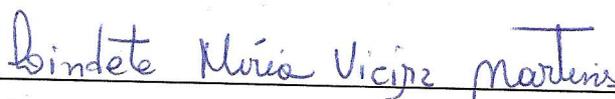
Banca Examinadora



Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior, UNIVASF (orientador)



Dr. Carlos Alberto Tuão Gava, EMBRAPA SEMIÁRIDO (examinador externo)



Prof^a. Dr^a. Lindete Míria Vieira Martins, UNEB (examinador externo)

À minha **mãe**, meu eterno amor...
Dedico (*em memória*).

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a **Deus** pelo dom da vida e por ter me guardado até o presente momento. Por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida. O seu nome seja hoje e eternamente louvado, amém.*

*À **minha família** por tudo que tenho e que sou, em especial ao meu **Pai Geraldo** que sempre fez tudo o que pode para me ver estudando e crescendo na vida, vocês são a minha base.*

*Ao meu orientador **Dr. Paulo Ivan** pela oportunidade de orientação, pela sua paciência e ensinamentos.*

*Agradeço imensamente a todos do Laboratório de Microbiologia do Solo que me receberam com carinho, me apoiaram e com bastante paciência me ensinaram muitas coisas novas: **Ana Karla, Jéssica, Jhonatam e Tainá**. **Aos estagiários que grandemente colaboraram: Thaisy, João Marcos, Wesley, Paula e Jéssica**. Aos amigos e companheiros do LMS que jamais esquecerei: **Tailane, Lucas, Neto, Claudia, Pâmela, Valéria e Alex**. E a todos os outros membros da EMBRAPA SEMIÁRIDO que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Aos meus amigos de todas as horas: **Djanara, Sueny, Felipe, David, Aparecida Nunes, Conceição, Thiago, Daniela, Izabel, Pâmala, Marcelino, Carolina, Rafael** e a todos os outros. Vocês são muito importantes para mim, obrigado pela escuta nos momentos de aflição durante esta jornada, cada um de vocês tem um lugar especial dentro do meu coração.*

*Ao meu querido **Lucas Lira** que por sua presença e disposição tornou-se alguém tão especial para mim.*

*À Prof^a **Dra. Erika Epiphanio** pelo acolhimento e ajuda em um dos momentos que mais precisei.*

*À minha psicoterapeuta **Anne Grazielle** por seu trabalho que foi muito significativo para a minha caminhada.*

*À Universidade Federal do Vale do São Francisco (**UNIVASF**) pela oportunidade do mestrado e a todos os professores da Pgrnsa pelas contribuições diversas.*

*À **FACEPE** pelo apoio financeiro.*

*À **EMBRAPA SEMIÁRIDO** pelo espaço e condições cedidas.*

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigado!

A vida é o filme que você vê através dos seus próprios olhos.

Faz pouca diferença o que está acontecendo.

É como você percebe que conta.

DENIS WAITLEY

RESUMO

Os rizóbios representam um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) conhecidas pela sua habilidade em disponibilizar N às leguminosas e favorecer o estabelecimento das plantas. A utilização de estirpes eficientes nesse processo favorece a redução do uso de fertilizantes nitrogenados. Dessa forma, estudos que visem conhecer, identificar, caracterizar e avaliar a diversidade dessas bactérias e os aspectos ligados à sua eficiência simbiótica são de grande importância. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade e eficiência simbiótica de bactérias oriundas de sete espécies de leguminosas arbóreas nativas da caatinga, depositadas na Coleção de Culturas de Microorganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido. Após a certificação da pureza do estoque das bactérias, os isolados tiveram o DNA extraído e passaram então por uma seleção através da amplificação de fragmentos dos genes simbióticos *nifH* e *nodA*. Os isolados que tiveram amplificação positiva para um dos genes *nifH/nodA* foram selecionados para as reações de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e as sequências obtidas foram utilizadas para comparação com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud. As bactérias de Algaroba (*Prosopis juliflora*), representavam 48 % do total das 94 estirpes que mostraram crescimento em meio YM e posteriormente avaliadas quanto à presença dos dois genes simbióticos, por essa razão, e com base nos resultados das amplificações, foram selecionados 33 isolados de Algaroba para posterior amplificação do gene 16S rRNA, juntamente com estirpes isoladas de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*). Todos os isolados de Algaroba foram identificados como pertencentes a gêneros não rizobianos, justificando a não continuação do seu estudo. Os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias de Jurema Preta mostraram um total de 14 estirpes como pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* sp. e 2 do gênero *Rhizobium* sp. Para esses mesmos isolados, foi realizado um BOX-PCR, afim de verificar a sua variabilidade genética, revelando um alto grau de polimorfismo. Em seguida as bactérias de Jurema Preta foram testadas em um experimento de casa de vegetação com feijão caupi (*Vigna unguiculata*) para determinação da eficiência simbiótica. O resultado obtido no experimento de eficiência destaca esse grupo de rizóbios como não nodulantes de feijão-caupi, por nenhuma bactéria desse estudo ter formado nódulos com esta leguminosa.

Palavras Chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. Biodiversidade. Caatinga. *Paraburkholderia*. Jurema Preta.

ABSTRACT

Rhizobia represent a group of bacteria nitrogen fixers (BNF) known for their ability to provide legumes availability and favor the establishment of plants. From this process, there is a reduction in the use of nitrogen fertilizers. Thus, studies aimed at identifying, characterize and analyze the diversity of this bacteria and aspects related to its symbiotic efficiency are of great importance. The purpose of this work was analyze the diversity and the symbiotic evaluation of bacteria from seven species of native trees of the caatinga, deposited in the Collection of Cultures of Microorganisms of Agricultural Interest of Embrapa Semiárido. After the certification of the bacterial stock, the isolated had the DNA extracted and started to be transmitted through the amplification of the fragments of the symbiotic genes *nifH* and *nodA*. The genes that had positive amplification for one of the *nifH* / *nodA* genes were selected for the partial sequencing reactions of the 16S rRNA gene and the sequences obtained were used for comparison with those available on the database EzBioCloud. The Algaroba bacteria (*Prosopis juliflora*) represented 48% of the 94 strains that presented growth in the medium YM and were analyzed for the presence of the two symbiotic genes, for that reason, and based on the results of the amplifications, 33 of the Algaroba isolated were selected for further amplification of the 16S rRNA gene, along with strains isolated from Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*). All isolated of Algaroba were identified as belonging to non-rhizobian genera, justifying the non-continuation of their study. The results of the 16S rRNA gene sequencing of the Jurema Preta bacteria showed a total of 14 strains as belonging to the genus *Paraburkholderia* sp. and 2 of the genus *Rhizobium* sp. For these same isolates, a BOX-PCR was performed to verify their genetic variability, revealing a high degree of polymorphism. Then, the bacteria of Jurema Preta were tested in a greenhouse experiment with cowpea beans (*Vigna unguiculata*) for the determination of symbiotic efficiency. The result obtained in the efficiency experiment highlights this group of rhizobia as non-nodulants of cowpea beans, because no bacteria of this study have formed nodules with this legume.

Keywords: Nitrogen Biological Fixation. Biodiversity. Caatinga. *Paraburkholderia*. Jurema Preta.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. Habitat (A); Folhas (B); Caule (C); Ramo aculeado (D); Fruto maduro (E); Flores (F).....28
- Figura 2.** Box-PCR dos isolados de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*)46
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade de isolados de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*), 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.....46
- Figura 4.** Árvore filogenética montada com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos classificados como *Paraburkholderia* e *Rhizobium*. Agrupamento utilizado o método Neighbor-Joining e o modelo Jukes - Cantor.....53
- Figura 5.** Avaliação da eficiência simbiótica de estirpes de Jurema preta em Feijão-caupi. Tratamentos inoculados com os isolados: (A) BR3267 e 1690; (B) 16119 e BR3267; (C) 1694, 16101, 16105 e BR3267; (D) 16111, 16100 e 1692.....58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação dos isolados bacterianos de Algaroba por meio da comparação das sequências parciais (>900 pb) do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud48
- Tabela 2.** Identificação dos isolados bacterianos de Jurema Preta por meio da comparação das sequências parciais (>800 pb) do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud52
- Tabela 4.** Produção de massa da parte aérea seca (MPAS) e massa de raiz seca (MSR) obtidos no ensaio de nodulação de Jurema Preta59

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ADE – Água destilada estéril

AIA – Ácido Indolacético

EPS- Exopolissacarídeos

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

YMA – Yeast Manintol Agar

PCR- Reação de polimerase em cadeia

mg/g- miligrama por grama

mL- mililitro

mM- milimolar

N - Nitrogênio

RPM- rotações por minuto

µg mL⁻¹- micrograma por mililitro

UV – Ultravioleta

UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 O Bioma Caatinga e a Região Semiárida.....	19
3.2 Família Fabaceae (Leguminosas arbóreas da Caatinga).....	21
3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	28
3.4 Bactérias diazotróficas	30
3.4.1 Caracterização Fenotípica de Rizóbios nodulantes de leguminosas	32
3.4.2 Caracterização Genotípica de Rizóbios nodulantes de leguminosas.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 ORIGEM E VIABILIDADE DOS ISOLADOS	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS	38
4.2.1 Extração do DNA.....	38
4.2.2 Seleção dos isolados por meio da amplificação dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodA</i>	38
4.2.3 Identificação dos isolados de Algaroba e Jurema Preta pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	40
4.2.4 BOX – PCR dos isolados de Jurema Preta	41
4.3 TESTE DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE JUREMA-PRETA COM FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Caracterização molecular.....	43
5.1.1 Seleção dos isolados por meio da amplificação dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodA</i>	43

5.1.2 BOX – PCR dos isolados de Jurema Preta	44
5.1.3 Identificação dos isolados de Algaroba e Jurema Preta pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	47
5.2 TESTE DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE JUREMA-PRETA COM FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO	54
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

A caatinga é o único Bioma exclusivo do território brasileiro, ocupando basicamente a Região Nordeste, com algumas áreas no estado de Minas Gerais. Sua predominância encontra-se na região nordeste, onde ocupa 844.453 Km² (IBGE, 2004), correspondendo a cerca de 11% do território nacional (HAUFF, 2010).

A região é caracterizada por baixos índices pluviométricos e temperaturas elevadas. A escassez e a distribuição irregular das chuvas nas áreas da Caatinga associadas às especificidades climáticas e o modelo de ocupação territorial são agentes responsáveis pelo desencadeamento de processos de desertificação em algumas áreas desde bioma (QUEIROZ, 2009).

Cerca de 62% de áreas do território brasileiro susceptíveis à desertificação encontra-se no Bioma Caatinga. Sendo assim, a exploração sustentável desse Bioma tem sido um grande desafio. A preservação da flora está intensamente associada ao combate à desertificação e processos de degradação ambiental que ocorrem em áreas áridas, semiáridas e sub-úmidas secas (HAUFF, 2010).

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais importantes para os organismos vivos. Ele é encontrado em muitos compostos fundamentais para a vida, incluindo, os ácidos nucleicos, as proteínas, vitaminas e os hormônios.

O nitrogênio é fundamental para o crescimento das plantas, é essencial na síntese de clorofila, para a formação de proteínas, enzimas, DNA e RNA. Esse elemento é encontrado na forma de N₂ na atmosfera, constituindo cerca de 78% desta. No entanto, na sua forma molecular não pode ser absorvido diretamente pela planta por conta da sua tripla ligação que o torna inerte, sendo imprescindível que essa ligação seja quebrada e o vegetal possa absorvê-lo na sua forma assimilável. Para que isso aconteça se faz necessário a presença da enzima nitrogenase, capaz de transformar o N₂ atmosférico em íons amônio. Essa baixa especificidade enzimática do vegetal para romper essa tripla ligação torna-o bastante suscetível a realizar simbiose com microrganismos portadores da nitrogenase.

Os microrganismos diazotróficos, conhecidos coletivamente como rizóbios, por conter a enzima nitrogenase são capazes de converter o gás nitrogênio atmosférico

em íons amônio assimiláveis pelas plantas, por meio do fenômeno chamado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), sendo muito comum, por exemplo, a simbiose entre essas bactérias com plantas da família *Leguminosae*. O uso de microrganismos diazotróficos é uma alternativa viável para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados que causam impactos ecológicos negativos, além de ser de grande valia para aprimorar os rendimentos da agricultura sem impactar o meio ambiente (DALL'AGNOL, 2016; RODRIGUES et al., 2016).

Plantas da família *Fabaceae* possuem um conhecido e consagrado sucesso na eficiência do processo de FBN, o aprimoramento desse processo pode trazer benefícios em grande escala, visto que as espécies arbóreas dessa família são de suma importância na produção de alimentos, fibra e energia, dentre outros (VARGAS MOTTA et al., 2012). Algumas plantas da família *leguminosae* podem obter até 100% da sua demanda de N via FBN (MEDEIROS et al., 2009).

Paraburkholderia nodulantes tem se mostrado eficientes fixadoras de nitrogênio, especialmente com espécies de *Mimosa* e *Piptadenia* (BOURNAUD et al., 2013). Nos últimos tempos, uma grande variedade de espécies de alfa e beta-proteobactérias vem sendo descritas por vários grupos de pesquisa, revelando um interesse crescente por estes microrganismos.

Dessa maneira, os estudos de caracterização fenotípica e da variabilidade genética desses microrganismos são de grande importância para o entendimento da biodiversidade e seleção de bactérias simbioticamente eficientes.

Para identificar e classificar corretamente um determinado isolado, análises polifásicas que levem em consideração a sua variabilidade molecular e capacidade de nodulação se fazem necessárias afim de obter resultados promissores a respeito da descoberta de estirpes de alfa e beta-rizóbios eficientes, competitivas e de alto poder de fixação de N₂, fornecendo dados para pesquisas futuras que envolvam essas bactérias. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade fenotípica, simbiótica e molecular de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas nativas (Angico, Leucena, Mulungu, Sabiá, Jurema-Rosa, Algaroba e Jurema-Preta) cultivadas em solos de áreas da Caatinga densa e Caatinga aberta do Semiárido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade e a eficiência de 384 bactérias nativas isoladas de nódulos de sete leguminosas arbóreas cultivadas em diferentes solos do Semiárido utilizando uma abordagem polifásica levando em consideração suas características moleculares e de eficiência simbiótica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade molecular dos isolados por meio do sequenciamento parcial de genes simbióticos e do 16S rRNA através de uma reação PCR (Reação em cadeia da polimerase).
- Avaliar a eficiência simbiótica dos isolados selecionados por meio de experimento em condições de casa de vegetação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O Bioma Caatinga e a Região Semiárida

O bioma Caatinga é distribuído geograficamente em sua maior parte no Nordeste no Brasil, engloba os estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas, Bahia, Sergipe, Piauí e ainda o norte de Minas Gerais, tomando cerca de 850.000 Km² do território nacional. Os baixos índices pluviométricos, altas temperaturas e regime de chuvas distribuídas irregularmente no tempo e espaço, ocasionando longos períodos de estiagem, são características desse ecossistema que, do ponto de vista geográfico, é um dos poucos que possui uma distribuição totalmente exclusiva do território brasileiro (ALBUQUERQUE et al., 2012).

A Caatinga, quando comparada com outras formações brasileiras, possui particularidades meteorológicas como baixa nebulosidade, temperaturas médias anuais mais altas como decorrência da mais alta radiação solar e conseqüentemente taxas de umidade relativa baixas. As precipitações pluviométricas concentradas em períodos curtos com médias anuais entre 280 a 800 mm, associadas a temperaturas predominantemente altas, com solos que apresentam variações em suas propriedades químicas e físicas (ÁGUILA, 2013). A evapotranspiração da região possui também índices muito elevados, podendo alcançar os 2700 mm anuais (ARAÚJO FILHO, 2013).

A vegetação da caatinga é composta, em sua grande parte por espécies arbustivas e arbóreas de pequeno porte, geralmente espinhosas, sendo, caducifólias, desfazendo-se de suas folhas no começo da estação seca. A frequência e dominância das espécies são determinadas pelas variações topográficas, pluviosidade e tipo de solo (SANTOS et al., 2013).

Em geral, são identificados 12 tipos de caatingas e apesar de apresentarem ampla diversidade da composição florística, dois modelos gerais são apresentados: a caatinga arbustiva-arbórea e a arbórea. A primeira é geralmente ocupada por atividades pastoris e é majoritária nos sertões semiáridos e a segunda, característica das vertentes e pés-de-serra e dos aluviões, sendo esta ocupada pela agricultura (ARAÚJO FILHO, 2013).

A família Fabaceae (Leguminosae) é uma das mais bem representadas nas caatingas com mais de 290 espécies catalogadas, pertencentes a 77 gêneros e com elevado endemismo (QUEIROZ, 2006). Várias das suas espécies são descritas por domínio filogenético na Caatinga (LIMA et al., 2014). As famílias mais frequentes são *Caesalpinaceae*, *Mimosaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae* e *Cactaceae*, sendo os gêneros *Mimosa* e *Pithecellobium* os com maior número de espécies. As plantas mais encontradas em diversos trabalhos de natureza quantitativa e qualitativa em diversas áreas da caatinga apresentam as plantas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), juremas (Mimosas) e os marmeleiros (*Cydonia oblonga*) como as mais abundantes, e que constituem espécies pioneiras do processo de sucessão secundária resultante da ação antrópica. A caatinga mostra-se bastante rica e diversificada, com grande potencial forrageiro, madeireiro, frutífero, medicinal e faunístico (ARAÚJO FILHO e CRISPIM, 2002).

Marcado pelo fenômeno de seca, sua paisagem apresenta-se de forma mais comumente retratada por uma vegetação de cor acinzentada, em períodos críticos de estiagem, por esta razão é chamada de caatinga, que significa mata branca ou cinza. Uma das características da caatinga é a caducifólia, caracterizada como a capacidade que a planta possui de em estações secas do ano, perder suas folhas, como um mecanismo para economizar água (SCHISTEK, 2001).

Entre outras características apropriadas às condições climáticas que a caatinga apresenta, está sua capacidade de reter água da chuva, seja no tronco, raízes ou no caule. Sua vegetação também apresenta troncos e galhos retorcidos e espinhosos (SILVA et al., 2003).

Durante muito tempo, essa vegetação foi tratada com preconceito pelo eurocentrismo da colonização, que a tomou como produto da degeneração de formações vegetais mais exuberantes, inclusive, chegou a ser considerada como natureza morta em período de estiagens em que a mesma se apresenta com cor acinzentada. Tudo isso porque a caatinga não atendia aos padrões até então conhecidos. Essa ideia preconceituosa da caatinga começa a ser desconstruída por meio de pesquisas científicas que contribuem para mostrar a ampla biodiversidade que constitui esse bioma e sua riqueza de recursos naturais (PORTO, 2002).

O Semiárido Nordeste apresenta uma ampla diversidade, tanto do ponto de vista do uso de seus recursos naturais, quanto da sua dinâmica socioeconômica.

Conhecida como “domínio da caatinga”, essa região engloba 925.043km², ou que representa 55,6% de todo Nordeste brasileiro. Com base na interação entre vegetação e solo, a região pode ser dividida nas seguintes zonas: domínio da vegetação hiperxerófila (34,3%); domínio da vegetação hipoxerófila (43,2%); ilhas úmidas (9,0%); e, agreste e área de transição (13,4%) (SILVA et al, 2003).

Segundo Nogueira e colaboradores (2012), a presença de leguminosas arbóreas nessas áreas estabelecem importância tanto econômica quanto ambientais devido a suas funções produtivas e protetoras do solo (como o controle da erosão, a estabilidade de taludes, barramentos e o aumento no estoque e qualidade da água).

Cerca de 70% da área da caatinga está propensa ao processo de desertificação, como consequência do manejo ambiental inadequado. Segundo Silva et al (2004), apesar da sua grande importância, a caatinga é provavelmente o Bioma mais ameaçado do Brasil, pois este possui apenas 4,71% de sua área protegida, um número muito reduzido para este Bioma que cobre uma área bastante significativa do território brasileiro (MATTAR et al., 2018).

3.2 Família Fabaceae (Leguminosas arbóreas da Caatinga)

A família Fabaceae (Leguminosae) compreende cerca de 727 gêneros e mais de 19.500 espécies. É considerada a terceira maior família das angiospermas em termos de números de espécies, ficando atrás apenas de Asteraceae e Orchidaceae (KAUR et al., 2013). Estudos recentes propuseram uma mudança na taxonomia de leguminosas que agora passam a ser subdivididas em seis subfamílias: Cercideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (AZANI et al., 2017).

Caesalpinioideae é a segunda maior subfamília de Leguminosae, compreende quatro tribos (Mimoseae, Mimozygantheae, Acacieae e Ingeae), com cerca de 4.400 espécies e 148 gêneros (AZANI et al., 2017). No Brasil, encontra-se representada por aproximadamente 824 espécies e 37 gêneros, dos quais Mimosa e Inga são os mais representativos (LIMA et al. 2014).

Dentro deste grupo, várias espécies são extremamente úteis para fins alimentícios (feijão, lentilha, ervilha); forrageiras (trevos, ervilhacas, alfafa); tânicas (acácia-negra); medicinais (pata-de-vaca, giesta); adubo verde (tremoços, guandú);

ornamentais (flamboyant, chuva-de ouro, corticeira), dentre várias outras finalidades. A utilização de leguminosas como fonte de alimentação básica é a característica que a faz tão lembrada. Feijões, favas, ervilha, lentilha, grão-de-bico, soja, tremoço e amendoim são algumas das faboídeas cultivadas pelas propriedades alimentícias de suas sementes, que são ricas em proteínas, ferro e carboidratos, nutrientes indispensáveis na dieta humana. Também é obtida das leguminosas uma variedade de produtos de uso industrial. Do angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. e a algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) se obtém madeiras para carpintaria e marcenaria. A indústria de couro se favorece do barbatimão e outras espécies, como o angico, que apresenta grande teor de tanino, substância essa que ligada ao colágeno, favorece o isolamento de fibras naturais contra micro-organismos responsáveis pela degradação da pele em seu estado natural.

O uso de plantas da família Leguminosae tem sido considerado também como uma das alternativas com elevado potencial no controle de áreas degradadas, pois estas possuem diversas características de adaptação ambiental, capacidade de uso e fixação de nitrogênio atmosférico (NOGUEIRA et al., 2012). A capacidade da maioria das espécies de leguminosas fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com rizóbio de solo é talvez a característica ecológica mais conhecida da família. Esses micro-organismos, denominadas diazotróficos, convertem o N₂ do ar em compostos nitrogenados assimiláveis pelos vegetais. A fixação biológica de nitrogênio realizada por rizóbio na sua relação simbiótica com leguminosa possui potencial para ajudar na recuperação de solos degradados, que por conta da intensa perda de matéria orgânica, são geralmente deficientes de nitrogênio (TRANNIN et al., 2001).

A importância do papel de leguminosas para o ecossistema é inquestionável, pois além de sua capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio, destaca-se também sua importância econômica, que está relacionada não apenas à sua distribuição geográfica como, também, a uma maior eficiência resultante de uma parceria planta e micro-organismo mais avançada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estudos realizados por Silva (2015) na caatinga madura no estado de Pernambuco, por exemplo, indicam que a FBN pode ser responsável por mais de 70% do N₂ absorvido por Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*).

No presente estudo foram utilizadas bactérias de sete hospedeiros cujas principais características são descritas a seguir.

A algaroba (*Prosopis juliflora* Sw. DC.) que pertence à família Fabaceae – Mimosoideae, é originada da América Central e do norte da América do Sul. No Brasil, é cultivada principalmente na Região Nordeste, onde se adaptou bem às condições edafoclimáticas locais, sendo que a sua introdução ocorreu na década de 40, em Serra Talhada, PE (RIBASKI et al., 2009). Esta cultura arbórea difundiu-se e durante algumas décadas, os órgãos governamentais estimularam seu plantio. Dos pequenos arboretos cultivados pela população rural aos plantios comerciais, a algaroba expandiu-se em larga escala, tendo sua disseminação facilitada pelos rebanhos, haja vista que seus frutos constituem forragem de boa qualidade (ANDRADE et al, 2009). Essa leguminosa tem sido apresentada e difundida como uma promissora alternativa econômica, tendo em vista sua adaptação em diversas regiões semi- áridas do mundo e por ser uma espécie de amplo uso, dentre eles destacam-se, produção de lenha, madeira, forragem e outros produtos. O gênero pode ser diagnosticado pela presença de espinhos em cada nó, flores pediceladas e frutos com endocarpo (QUEIROZ, 2009). Pode chegar até 8 m de altura, sendo que em condições ótimas chega a 18 m (DRUMOND et al., 2010). Segundo RIBASKI et al, (2009) a espécie vegeta bem em regiões com baixa precipitação pluviométrica, resistindo a longos períodos de estiagens, possui ainda potencial para restabelecer a fertilidade e produtividade de solos salinos degradados e para o reflorestamento (SILVA, 2007).

O angico (*Anadenanthera colubrina* Vell Brenan) que é classificado na família Fabaceae – Mimosoideae, apresenta: crescimento rápido, vegetar tanto em solos secos como úmidos, a sua altura na Caatinga pode chegar até 15 m, o caule tem variações tanto na cor como na textura, bastante conhecida pelo teor de tanino em sua casca e seu indispensável emprego na indústria de curtume e medicina popular. Suas folhas são pequenas, compostas, bipinadas e quando fenadas ou secas constituem forragem para bovinos, caprinos e ovinos. As flores podem ser brancas ou amarelo-esverdeadas e os frutos têm formato de vargens achatadas, finas e de cor castanho-avermelhada (MAIA, 2012). Além de ter crescimento rápido e desempenhar importante papel no enriquecimento do solo com nitrogênio a espécie

tem potencial na recuperação de áreas degradadas devido sua rapidez de germinação numa larga faixa de temperatura, favorecendo uma rápida cobertura do solo (MAIA, 2012). Prestes (2007) sugere que um dos principais fatores para se levar em consideração na escolha da espécie a ser utilizada na recuperação de solos degradados é justamente um crescimento rápido. Tendo em consideração esses aspectos e considerando que *Anadenanthera colubrina* apresenta um importante papel socioambiental, seu estudo é de ampla relevância.

A *Mimosa verrucosa* Benth (Leguminosae), conhecida como “jurema-da-flor-rosa” ou “jurema lisa”, da família Fabaceae-Mimosoideae é uma espécie arbórea arbustiva nativa da Caatinga. Apresenta melhor desenvolvimento principalmente em solos arenosos. Pode chegar até 6 m de altura, suas folhas são acinzentadas, as flores representam um grande potencial ornamental, possui importante papel para a economia na apicultura, devido ao uso do seu néctar e pólen no processo de fabricação do mel produzido em diversos locais do Nordeste (DEMARTELAERE et al., 2010). Dentre o gênero *Mimosa* é diferenciado principalmente pela presença de tricomas verrucosos nos ramos jovens, eixos foliares e face abaxial dos folíolos, conferindo-lhes um aspecto granuloso. Os frutos são uma das principais características dessa planta, sendo do tipo legume e a espécie é relatada como boa forrageira. Apresentam sementes com embrião conspicuo e praticamente sem endosperma, as sementes podem ficar revestidas por um tecido membranáceo sem forma definida, situação em que a testa pode não se diferenciar (QUEIROZ, 2009).

A leucena (*Leucaena leucocephala*) é uma leguminosa perene, classificada na família Faboideae – Mimosoideae, originária da América Central, está entre as espécies leguminosas de crescimento rápido. No Brasil ela é encontrada em quase todos os estados, principalmente na região nordeste, considerada como uma das forrageiras mais promissoras para a região semiárida e uma boa alternativa para recuperação de áreas degradadas (RESENDE e KONDO, 2001). A leucina possui múltiplos usos, sendo utilizada também em consórcio com culturas, na produção de sementes e na adubação verde e pode ser recomendada para reflorestamento, conservação do solo e para o enriquecimento da Caatinga (SOUZA et al., 2007). É uma planta arbórea-arbustiva, podendo chegar até 20 m. Apresenta folhas bipinadas, numerosas flores brancas, frutos no formato de vagens estreitas e sementes achatadas de coloração marrom. É considerada dentre as espécies

pertencentes ao gênero a mais difundida e de maior distribuição geográfica (DRUMOND et al., 2010). Para Lima e Evangelista (2006), dentre outras características vantajosas desta espécie, está a sua habilidade de desenvolver-se em solos de baixa fertilidade, ciclo longo, dispersão rápida, promover uma efetiva ciclagem de nutrientes, elevado valor alimentício, e uma excelente aceitabilidade pelos animais, fazem da *Leucena* uma espécie com potencial de uso em sistemas agrícolas.

Pertencente à subfamília Faboideae (Papilionoideae), o Mulungu (*Erythrina velutina*), conhecida popularmente também como bucaré, mulungu-da-flor-vermelha, mulungu-da-flor-amarela, muchôco e mulungá. Ocorre em todos os estados da região nordeste e em Minas Gerais, englobando os biomas Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado, além do Rio de Janeiro e São Paulo (APNE/CNIP, 2014). É uma árvore de porte arbóreo, com alturas entre 15 e 20 m na idade adulta com caule robusto e revestido por acúleos cônicos. A casca é levemente estriada, com espessura de até 0,25 cm. Suas folhas são compostas trifoliadas, sustentadas por pecíolo de 6 cm a 14 cm de comprimento; os folíolos são orbiculares, oval-rômbeos ou triangulares, de consistência cartácea, com a face ventral apenas pulverulenta e dorsal de cor verde mais clara, revestida por densa pilosidade feltrosa, medindo de 6 cm a 12 cm de comprimento por 5 cm a 14 cm de largura. Suas flores surgem a partir do final do mês de agosto, podendo se estender até dezembro. Possuem vexilo alaranjado ou vermelho-rutilante. Seu fruto é um legume um tanto curvo com ápices e bases agudas, internamente não-septado, com 1 a 3 sementes, eles amadurecem durante os dois primeiros meses do ano. Suas sementes são bicolores, denominadas miméticas, de coloração vermelho-escura e vermelho-alaranjada (CASTRO e VACALCANTE, 2011; CARVALHO, 2008). O mulungu possui diversas utilidades, tais como: alimentação, artesanato, produção de corantes, medicina popular, paisagismo e recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2008).

Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) – É geralmente encontrada na região nordeste do Brasil. Essa espécie ocorre naturalmente em terrenos profundos, principalmente em solos de textura arenosa. Por sua baixa exigência em fertilidade e umidade dos solos, desenvolve-se bem inclusive em áreas muito degradadas, onde tenha havido movimentação de terra e exposição do subsolo (RIBASKI et al., 2003).

Na idade adulta as árvores maiores atingem dimensões próximas a 10 m de altura e 30 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo). Seu caule jovem é pouco espinhoso, perdendo os espinhos à medida que a casca engrossa. As folhas são compostas bipinadas, alternas, geralmente com seis pinas opostas. Cada pina é comumente provida de quatro a oito folíolos glabros, opostos e discolores, medindo de 3 a 8 cm de comprimento, lisos e com a nervação semi-imersa na face inferior, mais claros e exibindo nervuras bastante proeminentes, em cujas axilas basais há uma barba composta de pelos visíveis com o auxílio de lupa; o pecíolo mede de 2 a 5 cm. Suas flores brancas e pequenas são bissexuais e dispersas em inflorescências do tipo espigas cilíndricas, medindo de 5 a 10 cm de comprimento, axilares e ordenadas em panículas terminais (CARVALHO, 2007). O fruto é um craspédio articulado plano. Cada seguimento contém uma semente lisa, dura e de cor castanho claro. Seu sistema radicular é bem adaptado às condições climáticas (MAIA, 2012). A espécie apresenta rápido crescimento e pode ser cortada com apenas três anos de idade, aceitando cortes subsequentes. Sua madeira pesada é resistente à umidade e excelente para estacas, lenha, carvão, forquilha e esteios. Além de ser empregada como cerca viva defensiva, na restauração florestal, em sistemas agroflorestais, é recomendada para a recuperação de áreas degradadas. A folhagem constitui valiosa forragem para o gado durante a longa estiagem do sertão semiárido (BARBOSA et al., 2008).

A Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*) (Figura 1), é uma espécie arbórea pertencente à família leguminosae e subfamília Mimosoideae. Ocorre com frequência no semiárido de praticamente todos os estados do Nordeste. As características da planta incluem arbustos espinhosos, ramificadas, de porte arbustivo, com altura de 5 a 7 metros, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos (BEZERRA, 2008). Casca de cor castanho-escura, fendida longitudinalmente, grossa e rugosa. Inflorescência em espigas com flores amareladas e minúsculas. O fruto apresenta-se na forma de pequena vagem (2,5 a 5 cm de comprimento). Suas sementes são pequenas, ovais, achatadas e de coloração castanho-clara (CAMPANHA, 2010).

Seu uso é muito diverso, servindo como forrageira palatável para todos os animais domésticos, sendo indicada para composição de pastos arbóreos. Pode ser utilizada em manejo sustentável em áreas menos degradadas, produção de madeira,

lenha e carvão. Possui destacada importância na alimentação de abelhas. Durante a estação seca, estrategicamente perde suas folhas para economizar água. Essa espécie é pioneira e abundante em áreas degradadas da caatinga ocorrendo também em diversos tipos de solos. As folhas que caem fornecem nutrientes para o solo e o protege. As raízes participam na recuperação do nitrogênio no solo, preparando-o para o surgimento de plantas de maior exigência como, por exemplo, o cumaru, aroeira, juazeiro, dentre outras (CAMPANHA, 2010).

O uso desta planta na medicina popular também é muito recorrente, sua casca auxilia do tratamento de algumas enfermidades como queimaduras e inflamações, além de possuir atividade antimicrobiana. O chá da casca é utilizado em alguns rituais religiosos (BEZERRA, 2008). As propriedades medicinais desta espécie estão associadas à presença de metabólitos presentes, dentre elas, atividade analgésica, antioxidante, antiespasmolítica, anti-inflamatória e antimicrobiana (SOUZA et al., 2008). Além disso, a casca do caule possui uma alta concentração de alcaloides psicoativos, relacionados aos efeitos alucinógenos e sedativos.

Na região nordeste e em comunidades indígenas do Brasil, a casca do caule e da raiz são empregadas no tratamento de queimaduras e inflamações, tratamento de feridas e de patologias de origem venosa e úlcera da perna (BEZERRA, 2008; MAIA, 2004; SOUZA et al., 2008).

Figura 1. *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. Habitat (A); Folhas (B); Caule (C); Ramo aculeado (D); Fruto maduro (E); Flores (F)



Fonte: OLIVEIRA, 2011.

3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é um elemento químico que participa da composição de moléculas orgânicas de considerável importância para os seres vivos, como as proteínas e os ácidos nucleicos. Embora presente em grande quantidade na atmosfera, esse elemento não é assimilável a nenhum eucarioto (incluindo as plantas) e à maioria dos procariotos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Sendo assim, são poucos os organismos, animais e vegetais, capazes de assimilá-lo, isso acontece porque o nitrogênio atmosférico encontra-se na forma de N_2 caracterizando uma molécula de grande estabilidade devido à presença de uma forte ligação tríplice,

entre os dois átomos de N. É necessário que essa tripla ligação seja quebrada e o nitrogênio transformado em íons amônio, forma esta assimilável pelos vegetais. A função de transformar o nitrogênio existente no ar atmosférico em formas assimiláveis para plantas e animais é realizada por bactérias fixadoras de nitrogênio e algumas algas azuis (cianobactérias) que possuem a capacidade altamente especializada de assimilar o nitrogênio da atmosfera e convertê-lo numa forma que possa ser utilizado pelas células (MADIGAN et al., 2015).

A baixa disponibilidade de nitrogênio é um dos elementos com maior capacidade de comprometer o crescimento vegetal e a produção agrícola, entender as diversas formas de sua disponibilidade para as plantas, é algo extremamente necessário. De acordo com (HERRIDGE et al., 2008) o processo biológico é responsável por cerca de 65% do nitrogênio na forma assimilável disponibilizado aos vegetais, com estimativa de 33 a 46 toneladas de nitrogênio fixado biologicamente ao ano. A produção industrial contribui em média com 25% e os agentes não biológicos em torno de 10%. Esses dados apontam para a grande relevância da FBN para o fornecimento de N de forma assimilável pelos vegetais e conseqüentemente para a sua obtenção pelos seres vivos por intermédio da cadeia alimentar (HUNGRIA et al., 2001).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo natural que consiste na utilização do nitrogênio atmosférico (N_2) por algumas espécies de bactérias e archaea, um grupo seletivo de organismos unicelulares e procariotos, que realizam uma reação de redução do N_2 a NH_4^+ (forma essa assimilável pelas plantas). Isso é possível, devido à presença de um complexo enzimático denominado nitrogenase, responsável por romper a tripla ligação presente no N_2 atmosférico usando energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP). Essas enzimas são constituídas em sua forma mais abundante por duas unidades proteicas: a primeira uma ferro-proteína e a segunda ferro-molibdênio. A primeira unidade, conhecida por dinitrogenase redutase, se liga a ATP e atua como doador de elétrons, e a outra (dinitrogenase) reduz e coleta o substrato, (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; HOWARD et al., 2013). A FBN é considerada o processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

A capacidade diazotrófica está limitada a bactéria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA &

SIQUEIRA, 2006). Essas bactérias vivem acopladas nas raízes das plantas em relação de simbiose/mutualismo com essas, produzindo nódulos, estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. Por essa razão a associação entre rizóbios e leguminosas torna-se um tipo de associação de extrema importância agrícola devido a sua peculiaridade na capacidade de formação de estruturas radiculares conhecidas como nódulos. As espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas desse grupo (GRAÇAS et al., 2015).

Bactérias do gênero *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente chamadas de rizóbio), são microrganismos rizosféricos, capazes de estabelecer relações de simbiose facultativa com leguminosas, especialmente espécies da subfamília Papilionoideae e Mimosoideae. Na intenção de produzir inoculantes comerciais a partir de estirpes eficientes que sejam capazes de fornecer o nitrogênio necessário para a produção de cultivares, numerosos estudos, objetivando levantamento, isolamento e seleção de rizóbio tem indicado um elevado índice de diversidade rizobiana do solo, especialmente em regiões tropicais (MELO e AZEVEDO., 1998). Os resultados mostram que a inoculação com essas estirpes é indicada em função da necessidade de aumentar a nodulação e a fixação de nitrogênio nas plantas (ARAUJO et al., 2007). A lista de rizóbios nodulantes de espécies nativas só cresce a cada dia e a ocorrência de novas espécies poderão vir a ser descritas, conforme aumenta a gama de conhecimentos sobre leguminosas tropicais e de respectivos rizóbios (MENEZES, 2013).

3.4 Bactérias diazotróficas

As bactérias diazotróficas podem ser caracterizadas como simbióticas mutualistas, como rizóbios, Frankia, Líquens e Anabaena, ou mesmo serem de vida livre, como cianobactérias, Beijerinckia e Clostridium.

Algumas espécies de vida livre vivem em associação com raízes de vegetais, por isso são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), devido à sua habilidade de interferir na morfologia dessas raízes e

consequentemente no crescimento das plantas. As espécies consideradas endofíticas facultativas, como as do gênero *Azospirillum*, sobrevivem tanto no interior das raízes e na sua superfície, como no solo. Outras não sobrevivem bem no solo, mas o fazem muito bem no interior de raízes e parte aérea de plantas, como (*Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*) e são conhecidas como endofíticas obrigatórias (BALDANI e BALDANI, 2005).

A capacidade diazotrófica não é algo restrito a um único grupo filogenético de bactérias. Segundo classificação a partir do sequenciamento de RNA ribossômico, existem bactérias fixadoras de nitrogênio em proteobactérias, cianobactérias, bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As alfas e betaproteobactérias podem se associar com as raízes de plantas da família Leguminosae (Fabaceae) (JUNIOR et al., 2017). Diante da diversidade de procariotos capazes de fixar nitrogênio, surge então um questionamento a respeito da origem de tal fenômeno. A explicação para essas características é baseada em três hipóteses. A primeira é que a capacidade diazotrófica teve origens múltiplas. A segunda é que teriam evoluído de um ancestral comum a todas as espécies, mas que foi perdido durante o processo natural evolutivo, dando origem a diferentes ramos filogenéticos. Essa última pode ser sustentada com base na filogenia feita a partir do sequenciamento do gene *nifH*, que codifica uma das subunidades da nitrogenase, segue aquela dada pelo sequenciamento de RNA ribossômico, sugerindo a possibilidade de herança de um ancestral comum, bem como herança genética que atribui habilidade de fixação de nitrogênio pelo processo de reprodução. A terceira é que o potencial de FBN teve uma única origem, mas que se estendeu a outros ramos filogenéticos por transferência lateral de plasmídeos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Por estabelecerem relação próxima com os vegetais, esses microrganismos são considerados excelentes promissores de potencial tecnológico ainda não totalmente explorado. Entre as possíveis aplicações biotecnológicas dos produtos naturais desses microsimbiontes incluem a sua utilização na medicina, indústria farmacêutica e agricultura (STROBEL e DAISY., 2003).

Segundo Marin et al, (1999), conforme citado por Oliveira (2010), espécies arbóreas de interesse agrícola são os principais alvos de estudos das interações microrganismo-planta. Devido ao aumento de regiões de cultivo agrícola, a

disponibilidade de nitrogênio disponível tornou-se algo preocupante para a manutenção de diversas culturas. O uso de bactérias fixadoras de N₂ que vivem em relação de simbiose com plantas, tornou-se uma alternativa para o uso excessivo de suplementos nitrogenados, como o nitrato, contribuindo assim com melhorias significativas em diversos cultivos agrícolas. Por se tratar de um processo puramente biológico, os inoculantes à base de bactérias que realizam FBN não prejudica o meio ambiente. A busca pela promoção de rendimentos de cultivos agrícolas pode ser beneficiada através do estudo desses microorganismos, selecionando aqueles com maior eficácia.

3.4.1 Caracterização Fenotípica de Rizóbios nodulantes de leguminosas

A determinação da diversidade microbiana é obtida principalmente por técnicas moleculares. Entretanto, a avaliação de características culturais é o primeiro passo para a determinação de novos grupos taxonômicos de microrganismos. Por meio das características culturais que indicam diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas importantes entre microrganismos, pode ser realizada uma seleção prévia dos mesmos, contribuindo para estudos posteriores mais avançados (OLIVEIRA et al., 2010; HAMEED et al., 2004).

A seleção de estirpes de rizóbios, com propósito prático de inoculação em leguminosas tem sido alvo de muitos estudos (HARA e OLIVEIRA, 2005; ZAMAN-ALLAH et al., 2007). A seleção deve objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes em seu local de origem, sendo tais condições muitas vezes extremas, com solos ácidos e de baixa fertilidade.

Os principais parâmetros utilizados para a caracterização fenotípica de rizóbios são: tempo de crescimento em meio de cultura, pH do meio de cultura, produção de exopolissacarídeos (EPS), coloração e diâmetro de colônia (FERNANDES JUNIOR, 2009). Com relação ao tempo de crescimento, podem se formar cinco grupos: os de crescimento muito rápido, para colônias que podem ser visualizadas em até 1 dia após a incubação; rápidas, para aquelas que são visualizadas entre 2 e 3 dias; intermediárias, quando de 4 a 5 dias; lentas, quando

só podem ser visualizadas de 6 a 10 dias e muito lentas, quando isso só é possível passados 10 dias de incubação (MELLONI et al., 2006).

A alteração do pH do meio de cultura pode indicar a presença de três possíveis classes: estirpes que acidificam, que alcalinizam, ou que não alteram o pH do meio. Placas com meio YMA recém-preparadas usando o indicador azul de bromotimol, possuem pH em torno de 6,8 a 7,0 e cor verde. A mudança de pH alterará a cor do meio para amarelo (acidificação) ou azul (alcalinização). Rizóbios de crescimento rápido tendem a acidificar o meio, enquanto que os de crescimento lento tendem a alcalinizar (MARTINS *et al.*, 1997). A mudança de pH pode também estar relacionada com a taxonomia de rizóbios. Estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, são as que geralmente alcalinizam o meio de cultura, ao passo em que as de crescimento rápido pertencem ao gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Moreira & Pereira, 2001). As mudanças de pH promovidas por rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares por estirpes de crescimento rápido e a excreção consecutiva de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados com conseqüente liberação de cátions pelas estirpes de crescimento lento (MOREIRA & SIQUEIRA., 2006). A observação da cor do meio de cultura, nessas placas, permite a detecção rápida de contaminantes nas culturas de trabalho (ARAÚJO., 1994).

O diâmetro das colônias de isolados de rizóbios é um parâmetro que se correlaciona com várias outras características culturais, e são divididas em três grupos: as colônias puntiformes que medem até 1 mm, as que medem de 1mm a 2mm e maiores que 2mm. Esse parâmetro pode estar relacionado com outras características. Colônias com diâmetro menor que 1 mm possuem pouca produção de polissacarídeos, e colônias maiores que isso possuem um índice elevado de produção desse carboidrato (MARTINS *et al.*, 1997).

A produção de muco (polissacarídeos extracelulares) é outra característica usada na caracterização de rizóbios. As estirpes podem ser agrupadas em secas, quando não produzem goma. Para aquelas que produzem, existe uma divisão pela quantidade produzida que varia entre: alta, média e baixa. Estirpes de crescimento rápido geralmente são maiores produtores de goma, ao contrário dos rizóbios de crescimento lento que formam colônias com baixa ou nenhuma produção de muco.

A alta produção de exopolissacarídeos pode estar relacionada a uma maior tolerância a altas temperaturas (FERNANDES JUNIOR, 2009).

A coloração da colônia é considerada também como característica importante na triagem inicial dos isolados. Ela varia dentre os diferentes tipos de estirpes, podendo se apresentar incolor, branco, amarelo ou creme.

A descrição fenotípica de rizóbios pode contribuir não apenas com a caracterização de estirpes, mas também para a verificação de outros parâmetros de natureza ecológica e fisiológica dos isolados, como por exemplo, a verificação da provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais predominantes no ecossistema em que predominam esses microrganismos. A capacidade de crescimento em diferentes faixas de pH, concentração salina, altas temperaturas e a resistência intrínseca à antibióticos são outras técnicas utilizadas na caracterização “in vitro” como também na correlação de condições ambientais, que juntas favorecem a seleção de estirpes eficientes e resistentes a condições adversas (XAVIER *et al.*, 1998; OURARHI *et al.*, 2011).

3.4.2 Caracterização Genotípica de Rizóbios nodulantes de leguminosas

O progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes tem favorecido os estudos taxonômicos modernos, direcionados para moléculas de DNA e RNA. A caracterização genética de procariotos se beneficia significativamente com esse avanço e tais técnicas tem colaborado para a determinação e seleção de rizóbios, pois permitem a avaliação de um grande número de isolados em um curto espaço de tempo, fornecendo informações mais completas e precisas.

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da Polimerase) ganhou destaque nas últimas décadas por seu uso na detecção e identificação de microrganismos. Descrita por Mullis (1990), essa técnica permite a amplificação “in vitro”, de fragmentos definidos da molécula de DNA, permitindo uma caracterização mais apurada na taxonomia de rizóbios, diferenciando e identificando essas estirpes (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Ferramentas que permitam a identificação de estirpes de maneira rápida, segura e com baixo custo possuem extrema importância para o estudo da diversidade microbiana (MORETZSOHN et al., 2013).

O uso de oligonucleotídeos específicos (*primers*) que amplificam sequências alvo do DNA, por meio da técnica de PCR, proporciona a formação da chamada impressão digital do organismo (*fingerprinting*). Esse método tem sido empregado em larga escala no estudo da diversidade intra-específica de rizóbio, fazendo a distinção entre estirpes muito próximas (FERNANDES et al., 2003).

Os estudos da taxonomia de microrganismos diazotróficos sofreu grandes avanços graças às pesquisas em sequência de marcadores moleculares. As técnicas mais comumente usadas na distinção de estirpes pertencentes a espécies próximas são BOX-PCR, ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*) (STOCCO et al., 2008; VERSALOVIC et al., 1994). Os perfis gerados na amplificação realizada por meio da técnica BOX-PCR que baseia-se na amplificação de sequências repetitivas no genoma bacteriano, possui sensibilidade para diferenciar estirpes muito próximas dentro das espécies de rizóbio. Os padrões de amplificação utilizando *primers* BOX são geralmente utilizados para gerar impressões digitais (*fingerprints*) mais robustas e produzir padrões de fragmentos mais diversos. Essa técnica reúne várias vantagens, uma vez que trata-se de uma metodologia de fácil execução, rápida e de baixo custo que vem sendo utilizada em larga escala para avaliar a diversidade genética microbiana (MISHRA et al., 2015). Passari e colaboradores (2015) utilizaram a técnica de BOX-PCR para identificação de isolados de actinobactérias potencialmente endofíticos obtidos de tecidos de plantas.

O sequenciamento de genes que codificam para o RNA ribossomal (16 S, 23 S e 5S) tem sido amplamente empregados para estudos de diversidade e ocupa um lugar especial no estudo da ecologia e evolução microbiana (TRINGE and HUGENHOLTZ., 2008). Os RNAs ribossomais possuem funções altamente específicas e conservadas, não sofrendo mutações do ambiente ao longo do tempo (MOREIRA et al., 2010). A caracterização de estirpes utilizando genes simbióticos e altamente conservados é essencial para efeitos de comparação e seleção de rizóbios nativos, bem como sua relação com a planta hospedeira e entendimento de sua filogenia. Sendo o principal componente da subunidade ribossômica menor de

procariotos, o produto do gene 16S rRNA é constituído por moléculas de ácido ribonucleico e proteínas (ribozimas), a qual constitui parte do maquinário celular responsável pela síntese proteica. Assim, esse gene está presente em todas as bactérias, e pode servir como indicador de como esses microrganismos estiveram relacionados ao longo da evolução, isso é possível graças à característica conservativa desse gene no período de milhares de anos (TOLEDO et al., 2009).

Por meio do sequenciamento do 16S rRNA, tornou-se possível a identificação de outras bactérias que nodulam leguminosas. Ainda por volta de 2001, as bactérias diazotróficas eram classificadas como pertencentes à subclasse *α -proteobactéria*. Então, a partir de análise de sequências do gene 16S rRNA elucidou-se outras bactérias também capazes de nodular leguminosas, tais como do gênero *Burkholderia*, de β -proteobacteria (VANDAMME et al., 2002).

Dentre as novas técnicas moleculares de identificação taxonômica de procariotos, merece destaque o método por MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*), sua metodologia baseia-se na análise conjunta de múltiplos genes do metabolismo basal (genes *housekeeping*), os quais apresentam taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais, porém sem perder o alto grau de conservação das suas informações evolutivas (RIBEIRO et al., 2009). Desse modo, a análise por MLSA permitiria a elucidação e distinção entre espécies altamente relacionadas, que não seriam esclarecidas apenas com o gene 16S rRNA (DALL' AGNOL et al., 2012).

Portanto, para que a FBN traga benefícios maiores para as leguminosas, entre estas e a população rizobiana, a caracterização da diversidade de microrganismos, em termos taxonômicos, através de parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos torna-se algo essencial, a fim de identificar dentro da diversidade existente estirpes com maior competitividade, estabilidade genética e conseqüentemente com maior grau de eficiência simbiótica (PEREIRA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo e em Casa de Vegetação na Embrapa Semiárido no município de Petrolina-PE.

4.1 ORIGEM E VIABILIDADE DOS ISOLADOS

As bactérias foram previamente isoladas por MENEZES (2013) e RODRIGUES (2016) e armazenadas na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA) em ultrafreezer a -80 °C. As bactérias oriundas da Algaroba, Angico, Jurema-Rosa, Leucena, Sabiá e Mulungu, foram obtidas de sete amostras do horizonte superficial (0-20 cm) de solos de áreas da Caatinga, sendo cinco de áreas preservadas e duas de áreas consideradas degradadas, nos municípios de Juazeiro-BA, Araripina-PE e Lagoa Grande-PE. Para o isolamento dessas bactérias foram utilizadas seis leguminosas arbóreas (*Mimosa verrucosa*, *Mimosa caesalpinifolia*, *Anadenanthera colubrina*, *Erythrina velutina*, *Prosopis juliflora* e *Leucaena leucocephala*.) em experimentos de vasos com plantas-iscas. Essas bactérias foram caracterizadas culturalmente por MENEZES (2013), quanto ao tempo de crescimento, reação de pH no meio, cor da colônia e produção e tipo de muco. Sua análise filogenética não havia sido realizada.

As bactérias de Jurema-Preta foram isoladas por Rodrigues (2016) de solos provenientes de áreas da Caatinga densa e Caatinga aberta (em processo de regeneração) nos municípios de Caruaru, Garanhuns, Serra Talhada e Petrolina. Para essas bactérias, Rodrigues (2016) realizou a amplificação dos genes simbióticos *nodC* e *nifH*, análise de restrição do DNA Ribossomal amplificado (ARDRA), tolerância a altas concentrações de salinidade e temperatura, solubilização de fosfato, produção de AIA e capacidade de utilização de diversas fontes de carbono. A amplificação e sequenciamento de outros genes, bem como o teste de eficiência simbiótica em condições de casa de vegetação não haviam sido realizados.

No total, foram avaliadas inicialmente 384 bactérias isoladas de leguminosas das espécies: Algaroba, Angico, Jurema-Rosa, Leucena, Sabiá, Mulungu e Jurema-Preta. Todas as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de

cultura YMA e indicador azul de bromotimol, para avaliação da formação de colônias. As colônias formadas foram inoculadas sucessivas vezes no mesmo meio para obtenção de culturas puras.

Do total de 384 bactérias submetidas a análise da viabilidade do estoque 31,77% formaram colônias em placa, sendo 45 de Algaroba, 26 Leucena, 8 Mulungu, 8 Angico, 4 Sabiá, 3 Jurema Rosa e 28 de Jurema Preta.

4.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

4.2.1 Extração do DNA

Após crescer em placas de Petri com meio YMA e indicador azul de bromotimol, as colônias formadas passaram por processo de purificação, e avaliadas com base nas características fenotípicas, conforme descrito por Menezes (2013). Uma vez puras, as colônias crescidas foram isoladas e inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YM líquido sem indicador, e mantidas sob agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm), pelo tempo de crescimento adequado para cada estirpe. O DNA das amostras foi extraído utilizando um Kit de extração de DNA Wizard Genomic DNA Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante.

A confirmação do processo de extração foi realizada em gel de agarose 2%, utilizando uma alíquota de 3 μ L do material extraído e 3 μ L de tampão de amostra. O restante do material extraído foi estocado em freezer a -20 °C para posterior utilização.

4.2.2 Seleção dos isolados por meio da amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodA*

A amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodA* foi realizada com todos os 94 isolados que ainda não haviam sido submetidos a essa análise, como estratégia para seleção das estirpes de interesse, utilizando a técnica de PCR direta.

Os iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PoIR (ATSGCCATCATYTTCRCCGGA), foram utilizados para amplificação de um fragmento do gene *nifH*, em torno de 360 pb (POLY et al., 2001). As reações de amplificação foram dimensionadas para um volume final de 10 μ L contendo, tampão 1X, MgCl₂ 2,5 μ M, dNTP 1,2 μ M, Taq DNA polimerase 1 U, 1,0 μ M de cada iniciador do gene *nifH* e 1,0 μ L de DNA. As condições de reação consistiram de uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 5 min. A reação foi conduzida em um aparelho termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems, EUA).

Para amplificação de um fragmento do gene *nodA* de alfa rizóbio (Laguerre et al., 2001), foram utilizados os iniciadores NodA1F (TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA) e NodA1R (GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA). As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 μ L contendo, tampão 1X, MgCl₂ 2,5 μ M, dNTP 1,2 μ M, Taq DNA polimerase 1 U, 1,0 μ M dos iniciadores de *nodA* e 1,0 μ L de DNA. As condições de amplificação consistiram em uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 60 segundos e 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 5 min. Utilizou-se um aparelho termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems, EUA) para a condução da reação.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% a 100 V por 120 minutos, as amostras foram coradas com GelRed (Biotium), o gel foi visualizado em um fotodocumentador com luz UV.

Os isolados que mostraram amplificação positiva para ao menos um dos dois genes avaliados (*nifH* e/ou *nodA*) foram selecionados para continuação dos testes genotípicos.

4.2.3 Identificação dos isolados de Algaroba e Jurema Preta pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Todos os isolados de Algaroba e Jurema-Preta tiveram a região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA amplificada pela reação de polimerase em cadeia (PCR), para a determinação do seu posicionamento taxonômico. Utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACG) (WEISBURG et al., 1991). As amplificações por PCR tiveram um volume final de 10 μ L, contendo: tampão de reação 1X, $MgCl_2$ 0,4 μ M, dNTP 0,4 μ M, Taq DNA polimerase 0,2 μ M, 0,2 μ L dos primers e 0,2 μ L de DNA. As condições da reação foram de uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, anelamento 1 min a 58 °C; seguido de 35 ciclos com 1 min a 94 °C, 2 min a 72 °C e 5 min de extensão final a 72 °C. Para a purificação do produto de PCR foi utilizado o Kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen, em Seul, Coreia do Sul. A qualidade das sequências recebidas foi conferida utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências consideradas de boa qualidade (acima de 800 pb) foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). As sequências type strains (estirpe tipo) que obtiveram maior similaridade foram baixadas para o alinhamento e construção de árvores filogenéticas. As árvores filogenéticas foram feitas com o auxílio do programa MEGA 7, utilizando o método Neighbour-Joining e o modelo Jukes-Cantor (TAMURA et al., 2013).

4.2.4 BOX – PCR dos isolados de Jurema Preta

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o oligonucleotídeo BOX A1-R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico. As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 µL, utilizando: tampão de reação 1X, MgCl₂ 0,6 µL, dNTP 2,5 µL, Taq DNA polimerase 0,2 µL, 1,0 µL dos primers e 2,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 6 min, 35 ciclos de desnaturação (2 min a 94 °C), temperatura de anelamento de 52°C por 2 min e extensão (8 min a 72°C), um ciclo de extensão final a 72°C por 16 min (MARTIN *et al.*, 1992). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 100 V durante duas horas em gel de agarose a 1,0% e corado com Gel Red (Biotium) e fotografado em fotodocumentador de luz UV.

4.3 TESTE DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE JUREMA-PRETA COM FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

Foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação, a fim de avaliar a eficiência simbiótica das bactérias de Jurema-Preta com feijão-caupi. O experimento foi montado em condições estéreis de casa de vegetação, nas dependências da Embrapa Semiárido, onde foram avaliados 28 isolados de Jurema-Preta, previamente selecionados pelo BOX-PCR. As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool 96° GL (2 minutos) e hipoclorito de sódio 1% (7 minutos), lavada 10 vezes com água destilada estéril. Foram semeadas quatro sementes por vaso, e o desbaste foi feito 10 dias após a emergência (DAE), restando somente uma planta por vaso. O experimento foi realizado em vasos de plástico com capacidade para 500mL, contendo areia autoclavada (1 atm de pressão e temperatura de 120 °C durante 2 horas, três vezes, com intervalo mínimo de 48 horas entre as autoclavagens).

O inoculante consistiu em meio YM, com indicador azul de bromotimol, onde foram inoculados os isolados crescidos no período de dois a três dias em mesa de agitação a 120 rpm. A inoculação foi feita aplicando-se 4mL de cultivo de bactéria diretamente na semente logo após o plantio. Os vasos foram cobertos por areia autoclavada logo após o cultivo, para evitar qualquer tipo de contaminação.

A estirpe BR 3267 (SEMIA 6462), empregada como inoculante comercial para feijão Caupi, foi utilizada como referência. Além da estirpe de referência, utilizou-se também um tratamento controle absoluto isento de qualquer tipo de inoculação ou qualquer fonte de Nitrogênio, e um controle nitrogenado, o qual recebeu doses semanais de nitrato de amônio (100 mg de N planta⁻¹ semana⁻¹) também isento de bactéria.

As plantas receberam semanalmente solução nutritiva Norris e Date (1976), livre de nitrogênio, sendo aplicados 50 mL por planta, duas vezes por semana. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Todas as plantas receberam água destilada estéril (ADE) manualmente, a fim de evitar contaminações, conforme necessário.

As plantas foram coletadas aos 45 dias após o cultivo. Na colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, as raízes foram lavadas e os nódulos

destacados e contados. A parte aérea, as raízes e os nódulos foram acondicionados em sacos de papel e secados em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. As avaliações realizadas foram: a produção de matéria seca da parte aérea, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, segundo metodologia descrita em Tedesco et al. (1995) número de nódulos, massa dos nódulos secos e massa seca das raízes. Após o período de secagem e pesagem, a parte aérea foi moída e 50 mg acondicionados em folhas de estanho para a determinação do teor de nitrogênio, essa análise foi realizada por meio do analisador Elementar Vario EL TruSpec (Leco, EUA) e o método de combustão seca, no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal da Embrapa Semiárido.

Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro, realizados pelo programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização molecular

5.1.1 Seleção dos isolados por meio da amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodA*

A partir do DNA extraído dos 94 isolados, foi realizada a amplificação do fragmento dos dois genes simbióticos. Dentre os 45 isolados de Algaroba, todos amplificaram o gene *nifH*, e 28 amplificaram os dois genes. Para os 26 isolados de Leucena, 23 amplificaram o gene *nifH* e 10 amplificaram os dois genes, para os 8 isolados de Mulungú, 3 amplificaram o gene *nodA* e 8 tiveram amplificação positiva para os dois genes, para os 8 isolados de Angico, 6 amplificaram os dois genes simbióticos e apenas 2 amplificaram os dois genes, em relação aos 4 isolados de Sabiá, os 4 amplificaram para os dois genes e para os 3 isolados de Jurema-Rosa, 1 amplificou apenas o gene *nifH* e 2 amplificaram ambos os genes *nifH* + *nodA*.

Dos 94 isolados verificados quanto à amplificação dos genes *nifH* e *nodA*, 91 apresentaram amplificação positiva para ao menos um dos genes simbióticos, no entanto, referente ao gene *nodA*, 49 não amplificaram com os dois pares de iniciadores utilizados. Tal avaliação preliminar permitiu levantar a hipótese da presença de espécies não rizobianas presentes nos nódulos das culturas avaliadas.

Segundo Mothapo et al. (2013), a seleção preliminar de rizóbios por meio da amplificação prévia de genes simbióticos empregando um marcador molecular que aumenta a probabilidade de seleção de bactérias com potencial nodulante é uma abordagem recente e eficiente que possibilita a seleção assistida dos isolados para estudos futuros.

As bactérias de Algaroba representavam 48 % do total das 94 estirpes avaliadas quanto à presença dos dois genes simbióticos. Por essa razão, e com base nos resultados das amplificações, foram selecionados 33 isolados de Algaroba para posterior amplificação do gene 16S rRNA.

5.1.2 BOX – PCR dos isolados de Jurema Preta

O resultado da análise da variabilidade genética por BOX-PCR para os 24 isolados de Jurema Preta (Figura 2), mostra perfis de bandas bastante diversificados em todas as bactérias, com um complexo agrupamento entre os isolados. Foi construído um dendrograma de similaridade a partir dos dados gerados pela amplificação do primer BOX-A1R (Figura 3).

A análise indicou alta variabilidade entre os perfis de banda dos isolados formando-se, *a priori* quatro grandes agrupamentos com perfis de similaridade em torno de 75%, sendo que os clusters 1 e 2, apresentaram o maior número de agrupamentos (nove em cada grupo). Verificou-se que todos os isolados apresentaram em torno de 55% de similaridade e que não houve isolados com perfis 100% idênticos, mesmo aqueles classificados na mesma espécie, indicando a elevada biodiversidade dos isolados. Não foi possível observar agrupamento de acordo com o local de origem ou a espécie bacteriana, reiterando a grande variabilidade genética e o elevado grau de polimorfismo da coleção avaliada.

Diversos estudos de determinação das relações genéticas entre estirpes de rizóbio têm empregado a técnica do BOX-PCR com oligonucleotídeos específicos,

que codificam regiões altamente conservadas, normalmente no espaço intergênico, amplificando regiões palindrômicas e repetitivas do DNA cromossômico. A principal vantagem do uso desses oligonucleotídeos específicos para a caracterização molecular de bactérias está no fato de ser possível, em uma única reação, obter um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo entre os isolados, o que permitirá a comparação dos diferentes perfis de bactérias, resultando na sugestão de adoção desses perfis para o controle de qualidade de coleções de culturas de rizóbios, bem como para a distribuição das estirpes para a indústria de inoculantes (FERNANDES et al., 2003; MENNA et al., 2009). O estudo da diversidade de rizóbios nativos pode contribuir como fonte de recursos genéticos para seleção de estirpes adaptadas às diversas condições ambientais, como temperaturas elevadas e acidez do meio (MEDEIROS et al., 2009).

A grande diversidade genotípica encontrada entre os isolados de Jurema Preta e o alto grau de polimorfismo desses microssimbiontes, refletem a possibilidade de um elevado potencial de capacidade de fixação de nitrogênio entre as bactérias presentes na coleção, apontando também para a ampla biodiversidade de seus nichos de isolamento. Em trabalhos com estirpes do gênero *Paraburkholderia* isoladas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), Dall'Agnol et al. (2016), também encontraram alta variabilidade genética entre os isolados, com vários clusters principais e quase 100 perfis diferentes foram observados, além de algumas bactérias ocupando posições isoladas e com todas as estirpes apresentando nível final muito baixo de similaridade de 42%. Cadete et al. (2012), em estudos com bactérias diazotróficas capazes de solubilizar fosfato inorgânico, associadas a plantas de cana-de-açúcar, observaram também alta variabilidade genética por meio da análise de agrupamento. Os autores observaram a formação de três grupos distintos (clusters) com alta variabilidade entre as linhagens, apresentando, no máximo, 83% de similaridade entre poucas linhagens.

Os resultados aqui encontrados corroboram com os obtidos por Freitas et al. (2007), que colocam que o conhecimento polifásico deve ser aplicado à taxonomia e diversidade de rizóbios, visto que o conjunto de resultados combinados resultará em análises bem mais consistentes. Em estudos com três leguminosas arbóreas tropicais, Bala et al. (2003), identificaram 23 espécies dentro de um total de 414 isolados de rizóbios e ressaltaram a importância de uma análise polifásica para a

seleção de microrganismos. Foi constatado que o método BOX-PCR foi eficaz para diferenciar isolados fenotípicos e genotípicamente próximos, porém o emprego de uma única técnica limita bastante sua capacidade de detectar uma vasta heterogeneidade genética dos rizóbios avaliados (FREITAS et al., 2007).

Assim, uma análise mais aprofundada a respeito da coleção avaliada é um fator de mera importância, sua realização pode contribuir com um diagnóstico mais preciso a respeito da filogenia dos isolados. Tendo isso em vista realizou-se neste estudo o sequenciamento da região 16S do DNA ribossômico dessas bactérias.

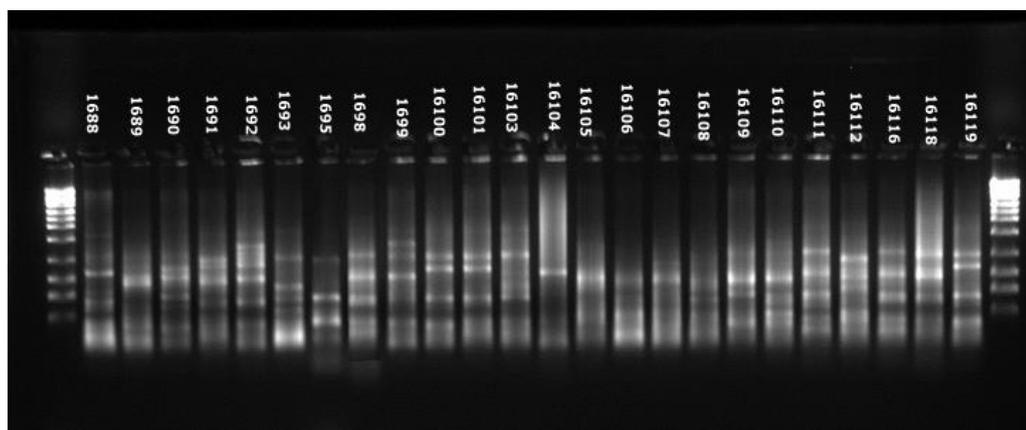


Figura 2. Padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-A1R dos 24 isolados de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*).

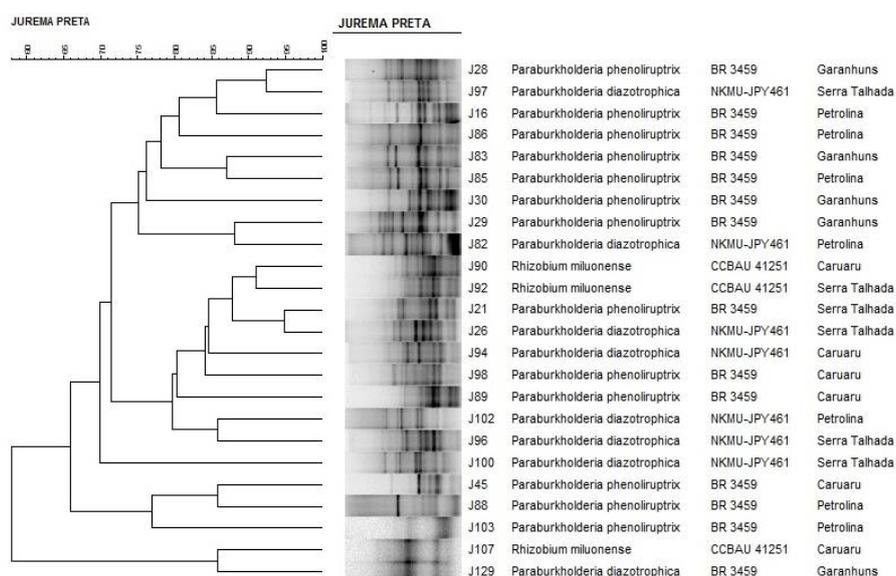


Figura 3. Dendrograma de similaridade de isolados de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*), após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos após a amplificação do DNA por BOX-PCR com o oligonucleotídeo específico BOX-A1R. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente Dice.

5.1.3 Identificação dos isolados de Algaroba e Jurema Preta pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Foi realizada a amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, para sequenciamento e identificação, dos 33 isolados de Algaroba selecionados anteriormente com base na amplificação dos genes simbióticos. Também foi realizado o sequenciamento do 16S rRNA para as 28 bactérias de Jurema Preta.

Para análise dos produtos obtidos através do sequenciamento, as sequências recebidas foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados EzBioCloud. O programa SeqScanner foi utilizado para verificação da qualidade e tamanho das sequências recebidas, antes de serem comparadas no banco de dados.

Dentre as 33 bactérias de Algaroba identificadas, 25 tiveram tamanho de pares de bases satisfatórios para comparação no EzBioCloud. Dentre os 25 isolados analisados, 12 foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e as outras 13 com a seguinte distribuição: *Brevibacillus* (7 isolados), *Paenibacillus* (3 isolados), *Pantoea* (1 isolado), *Sphingomonas* (1 isolado), *Curtobacterium* (1 isolado). (Tabela 1).

O gene 16S rRNA caracteriza-se como o principal componente da subunidade ribossômica menor dos procariontes. Esse gene encontra-se presente em todas as bactérias e apresenta características altamente conservadas ao longo da evolução, sendo um bom indicador de como os microrganismos estiveram relacionados ao longo de milhões de anos. Ferramentas que permitam a identificação de estirpes de maneira rápida, confiável e de baixo custo são de extrema importância (TOLEDO et al., 2009). A algaroba é uma leguminosa arbórea com capacidade de associação simbiótica com bactérias diazotróficas, do gênero *Rhizobium*, permitindo por meio dessa associação, eficácia no processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (RIBASKI et al., 2009). Todos os gêneros encontrados neste trabalho caracterizam-se como não rizobianos.

Como não há relatos de associação da Algaroba com nenhum dos gêneros encontrados a partir da comparação da sequência do gene 16S rRNA no banco de dados EzBioCloud, optou-se por focar esforços na caracterização dos isolados de Jurema-preta.

TABELA 1. Identificação dos isolados bacterianos de Algaroba por meio da comparação das sequências parciais (≥ 800 pb) do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud.

Isolado	Tamanho do fragmento (pb)	Microrganismo (Gênero)	Porcentagem de Similaridade (%)	Número de acesso
A29	1,180	Brevibacillus choshinensis	99,07	AB112713
A30	1,080	Bacillus tequilensis	99,35	HQ223107
A31	1,098	Bacillus tequilensis	99,91	HQ223107
A33	1,117	Paenibacillus massiliensis	99,19	AY323608
A35	1,110	Bacillus tequilensis	99,91	HQ223107
A36	1,148	Brevibacillus nitrificans	99,74	AB507254
A37	1,095	Bacillus tequilensis	99,45	HQ223107
A39	1,070	Paenibacillus lautus	98,96	AB073188
A40	1,119	Bacillus tequilensis	99,82	HQ223107
A42	1,100	Pantoea vagans	99,18	EF688012
A43	1,105	Paenibacillus massiliensis	99,73	AY323608
A44	1,111	Bacillus safensis	99,82	AF234854
A45	964	Sphingomonas aquatilis	96,68	AF131295
A46	1,124	Brevibacillus nitrificans	99,91	AB507254
A47	1,112	Curtobacterium citreum	99,91	X77436
A49	1,119	Bacillus tequilensis	99,91	HQ223107
A50	1,017	Brevibacillus gelatini	99,02	KP899808
A52	1,170	Bacillus tequilensis	99,83	HQ223107
A53	1,130	Bacillus tequilensis	99,82	HQ223107
A54	1,269	Bacillus safensis	98,11	AF234854
A55	1,169	Brevibacillus nitrificans	99,40	AB507254
A57	1,089	Bacillus tequilensis	100	HQ223107
A58	1,100	Bacillus tequilensis	99,91	HQ223107
A59	1,092	Brevibacillus nitrificans	99,45	AB507254
A60	917	Brevibacillus formosus	98,91	AB112712

A amplificação do gene 16S rRNA dos isolados de Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*) foi realizada para as 28 bactérias selecionadas. Após a análise da qualidade das sequências feita no programa SeqScanner, 19 sequências apresentaram boa qualidade e tamanho adequado (aqui considerado como igual ou superior a 700pb) e foram utilizadas para comparação com aquelas depositadas no banco de dados EzBioCloud. Os resultados do tamanho dos fragmentos para os isolados representantes dos grupos, os respectivos gêneros correspondentes, a porcentagem de similaridade e o número de acesso encontram-se na tabela 2.

A análise do sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias avaliadas apresentou a minoria (10,53%) com similaridade com o gênero *Rhizobium* e a maioria (89,47%) com *Paraburkholderia*, gêneros que englobam bactérias formadoras de nódulos em leguminosas (PEIX et al., 2015), principalmente em membros do Clado Mimosoideae. Estudos recentes têm relatado espécies de *Mimosa* em associações simbióticas preferencialmente com rizóbios pertencentes à classe das β -proteobactérias, principalmente do gênero *Paraburkholderia* (BONTEMPS et al., 2015; LIU et al., 2012). No entanto, a preferência em se associar com β -rizóbios não diz respeito a todas as espécies do gênero *Mimosa*.

Recentemente Bontemps et al. (2015), observaram que no México, em um estudo realizado com espécies endêmicas de *Mimosa*, as plantas associaram-se preferencialmente com alfa-proteobactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Ensifer*. De acordo com esses autores, essa preferência diversificada das espécies de *Mimosa* em relação aos microsimbiontes, pode estar relacionada com a filogenia do hospedeiro, a co-evolução com simbiontes de solos diferentes e com o isolamento geográfico.

Em estudos recentes com espécies endêmicas de *Mimosa* e *Calliandra* de seis tipos de vegetação da Chapada Diamantina, no estado da Bahia – Brasil, Silva et al. (2018), verificaram uma preferência dessas leguminosas em formar nódulos com estirpes do gênero *Paraburkholderia* representantes da classe das β -proteobactérias. Em estudos com isolados do Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) no Nordeste Brasileiro, Martins et al. (2015), também encontraram cepas de *Paraburkholderia* nodulando espécie de *Mimosa*, enfatizando a afinidade dessa classe de microsimbiontes com espécies arbóreas da subfamília Mimosoideae.

Os isolados 16120, 16119, 16118, 16111, 16100, 1692, 1691, 1693, 1699, 16121 e 16101 apresentaram agrupamento com o grupo de *Paraburkholderia* que engloba as espécies *P. phenoliruptrix* e *P. graminis*, dentre outras. Os isolados 1690, 16105, 16110, 16109, 16107 e 16116 apresentaram agrupamento com outro grupo de *Paraburkholderia* filogeneticamente distinto que engloba *P. piptadeiae* e *P. diazotrophica* (fig. 3).

Outros dois isolados apresentaram afinidade filogenética com o gênero *Rhizobium* que engloba *R. mayense*, *R. milouense*, *R. tropici* (fig. 4).

A predominância de *Paraburkholderia* pode também estar associada às propriedades edáficas. Estudos sugerem que as propriedades do solo como o pH, quantidade de N e condições geográficas, como a altitude, contribuem para a predominância do gênero *Paraburkholderia* (LIU et al., 2014; LEMAIRE et al., 2015). Vários estudos apontam que a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) acontece mais frequentemente onde a oferta de nitrogênio é mais baixa. Por outro lado, mesmo em ambientes ricos em N, a FBN pode ser importante afim de compensar as perdas deste nutriente, evitando assim a sua depleção nestes solos (VITOUSEK et al., 2013). Alguns estudos sugerem que espécies de *Mimosa* tendem a se associar com β -proteobactérias quando cresce em solos com pH ácido e pouco fértil (LEMAIRE et al., 2015). Além desses fatores ambientais, a concentração de nitrogênio presente no solo também parece desempenhar um importante critério para a densidade rizobiana (ELLIOTT et al., 2009). Em um estudo comparativo entre bactérias de rizóbios e espécies de *Mimosa* quando essas crescem em substrato com baixa concentração de N, observa-se um destaque na nodulação com *Paraburkholderia* em relação a *Rhizobium*, tal situação é invertida ao aumentar a concentração de nitrogênio no ambiente (SUÁREZ-MORENO et al., 2012).

Isolados de *Paraburkholderia* foram majoritariamente obtidos por (PIRES et al., 2018) de diferentes locais dos biomas Cerrado e Caatinga no nordeste do Brasil, típicos de solos ácidos e com baixa quantidade de nutrientes. Esse estudo revelou que a predominância de rizóbios na formação de nódulos com *Mimosa* depende das propriedades o solo. Os solos mais ácidos e menos férteis favoreceu a associação de *Mimosa* com *Paraburkholderia*, enquanto o solo com pH próximo ao neutro e com maior fertilidade levou à associação com *Rhizobium*.

Embora *Paraburkholderia* não esteja restrita a solos ácidos, espécies desse gênero desenvolveram habilidades de tolerância à acidez o que lhes permitiu crescer em solos com condições nas quais outros grupos de simbiontes não se adaptariam bem (STOPNISEK et al., 2014). A predominância de *Paraburkholderia* também foi encontrada em alguns gêneros de leguminosas na cidade do Cabo na África do Sul em que os solos ácidos e pobres parecem beneficiar a associação entre bactérias de *Paraburkholderia* e leguminosas endêmicas da região (GARAU et al., 2009; LEMAIRE et al., 2016).

O gênero *Burkholderia* possui características de versatilidade, sendo adaptável a diversos ambientes e representando um componente significativo das comunidades microbianas presentes no solo (OREN e GARRITY, 2015). Nos últimos anos novas espécies desse gênero foram descritas ou reclassificadas, além disso, foram criados dois gêneros que abrangem as espécies ambientais, *Paraburkholderia* e *Caballeronia* (DOBRITSA e SAMADPOUR, 2016). O gênero *Paraburkholderia* também foi isolado de outras espécies de Mimosa, como *M. scabrella* e *M. bimucronata* por (Chen et al., 2007).

Vale ressaltar que alguns dos isolados apresentaram similaridade baixa com as sequências depositadas no EzBioCloud. Por exemplo, o isolado 16110, apresentou porcentagem de similaridade de 98,72% com a sequência de *Paraburkholderia diazotrophica* mais próxima (Tabela 2). Da mesma forma, os isolados 16121 e 1691 apresentaram respectivamente 94,47% e 95,79% de similaridade com as sequências mais próximas de *Paraburkholderia metrosidere*. Somente um isolado (16119) apresentou similaridade correspondente a 100%. Essa baixa similaridade pode indicar a possibilidade da existência de novas espécies dentre os isolados, no entanto, para assegurar estes graus de similaridade se faz necessário um novo sequenciamento destes fragmentos.

TABELA 2. Identificação dos isolados bacterianos de Jurema Preta por meio da comparação das sequências parciais (≥ 800 pb) do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis no banco de dados EzBioCloud

Isolado	Tamanho do fragmento (pb)	Microrganismo correspondente	Porcentagem de Similaridade (%)	Número de acesso
J56 16120	1,094	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,82	AY435213
J130 16119	1,074	Paraburkholderia phenoliruptrix	100	AY435213
J129 16118	1,123	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,91	AY435213
J119 16116	1,090	Paraburkholderia diazotrophica	99,63	HM366717
J103 16111	1,088	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,82	AY435213
J102 16110	1,090	Paraburkholderia diazotrophica	98,72	HM366717
J100 16109	820	Paraburkholderia diazotrophica	98,78	AY435213
J94 16105	1,120	Paraburkholderia diazotrophica	99,64	HM366717
J92 16104	1,069	Rhizobium mayense	99,35	JX855172
J88 16101	1,109	Paraburkholderia phenoliruptrix	98,92	AY435213
J86 16100	1,149	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,91	AY435213
J47 1695	820	Rhizobium mayense	99,51	JX855172
J30 1693	1,159	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,57	AY435213
J29 1692	1,126	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,64	AY435213
J28 1691	949	Paraburkholderia phenoliruptrix	99,58	AY435213
J26 1690	1,138	Paraburkholderia diazotrophica	99,65	HM366717
J97 16107	744	Paraburkholderia diazotrophica	99,42	JPY461
J77 16121	1,506	Paraburkholderia metrosidere	94,47	DNBP6-1
J85 1699	1,022	Paraburkholderia metrosidere	95,79	DNBP6-1



Figura 4. Árvore filogenética montada com base nas seqüências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos de Jurema Preta classificados como *Paraburkholderia* e *Rhizobium* e outras seqüências de estirpes referências disponíveis no EzBioCloud. Agrupamento utilizado o método Neighbor-Joining e o modelo Jukes-Cantor. Números de Bootstrap (1000 réplicas) superiores a 50%.

5.2 TESTE DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE JUREMA-PRETA COM FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

Todos os 28 isolados de nódulos de raízes de Jurema Preta, caracterizados a partir da análise de BOX-PCR e do sequenciamento do gene 16S rRNA, e testados em condições de casa de vegetação, não foram capazes de nodular as plantas de feijão-caupi. Não se constatou também a ocorrência de nodulação nas testemunhas com adubação nitrogenada ou nas testemunhas absolutas (livres de inoculação e adubação nitrogenada), o que indica a ausência de qualquer contaminação no experimento. A nodulação ocorreu apenas para as quatro repetições do tratamento inoculado com a estirpe de referência BR 3267, recomendada na cultura do feijão - caupi.

O feijão-caupi pode se beneficiar da associação simbiótica com rizóbios, sendo a FBN uma alternativa viável para o aumento do rendimento e produtividade da cultura, proporcionando ganhos econômicos e ambientais (ALMEIDA et al., 2010). Contudo, existe a necessidade de se obter rizóbios eficientes e adaptados às condições edafoclimáticas do ambiente de cultivo. Além dos fatores edafoclimáticos, esse processo também é influenciado pelas características genotípicas do macro e microsimbionte e modulado por uma intrínseca troca de sinais moleculares, refletindo as diferentes respostas em relação a faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica (XAVIER et al., 2006). Apesar da definição da faixa hospedeira ser de natureza variável, de modo geral tem sido observada especificidade simbiótica entre as espécies de rizóbio e leguminosas. O genótipo da planta por exemplo, pode desempenhar um papel fundamental na seleção do microsimbionte (SMITH e GOOMAN, 1999; PAFFETTI et al., 1998).

Para a implementação da tecnologia de inoculação de rizóbios em leguminosas, é necessário um ensaio para averiguar a compatibilidade e eficiência de nodulação dos mesmos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A realização de ensaios em condições controladas que verifiquem a capacidade simbiótica de bactérias diazotróficas e do nitrogênio fixado por meio de sua interação com a planta, tornam-se parâmetros importantes no processo de seleção de estirpes e na recomendação de inoculantes (RODRIGUES, 2016).

O feijão caupi é uma leguminosa com boa capacidade de fixar nitrogênio por meio da simbiose com uma grande variedade de espécies de bactérias do grupo dos rizóbios, sendo o gênero *Rhizobium* um dos seus alvos principais (GUIMARÃES et al., 2012; ZILLI et al., 2011). Leite et al. (2017), encontraram uma alta diversidade bacteriana associada ao feijão caupi, e com base no sequenciamento do gene 16S rRNA detectaram que a parcela majoritária desses simbiossitos pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium*.

Vários estudos desenvolvidos até o momento têm relatado a identificação de estirpes do grupo das α -proteobactérias, pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, provenientes de nódulos de feijão-caupi (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013). Em alguns trabalhos esses rizóbios caracterizaram-se por apresentarem crescimento lento, comum ao gênero *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2006), enquanto em outros verificou-se a presença de rizóbios de crescimento rápido, característica essa presente no gênero *Rhizobium* (ZHANG et al., 2007).

Em estudos com isolados de feijão-caupi de diferentes regiões da China, Zhang e colaboradores (2007), observaram por meio de análises moleculares do gene ribossomal 16S rRNA, estirpes com similaridade a *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*). Esses dados são corroborados pelos estudos de Costa et al. (2013), que isolaram bactérias nodulíferas de feijão caupi e essas foram identificadas com 99% de similaridade com os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Paenibacillus* e *Bacillus*. De maneira semelhante, a espécie *Microvirga vignae* faz parte da classe das alfa-proteobactérias e em trabalhos com essa espécie isolada a partir de solo do Semiárido brasileiro, Silva Júnior et al. (2014) verificaram que ela apresenta potencial para promoção da produtividade de grãos de feijão-caupi via FBN.

As bactérias avaliadas neste estudo foram classificadas com base no sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA, como *Paraburkholderia* e pertencentes à classe das β -proteobactérias, são estirpes com características nodulíferas e encontradas em predominância como noduladoras de várias espécies de *Mimosa* sp. Segundo LIU et al. (2012), o gênero *Mimosa* tem sido frequentemente nodulado por β -rizóbios. Da mesma forma, para Bontemps et al. (2010), espécies de *Mimosa* se associam preferencialmente com *Burkholderia*.

Em trabalhos recentes Sheu et al. (2012) e Chen et al. (2008) isolaram novas espécies de rizóbios de nódulos radiculares de *Mimosa* spp. e *Mimosa caesalpiniiifolia*, nativas do Nordeste, que também foram descritas como pertencentes ao gênero *Paraburkholderia symbiotica* sp. e *Paraburkholderia sabiae* sp. respectivamente.

Esses achados sugerem uma preferência de estirpes de *Paraburkholderia* em nodular alguns tipos de leguminosas em detrimento de outras. Santos et al. (2018), em trabalhos com cepas desse gênero, observaram por meio da análise filogenética dos genes *nifH* e *nodA* a formação de clados distintos entre as estirpes nodulantes das subfamílias *Papilionoideae* e *Mimosoideae*, onde o clado do grupo de *Mimosoideae* do estudo desses autores agrupou com espécies de *Paraburkholderia* empregadas no presente trabalho com os isolados de Jurema Preta, sendo utilizadas aqui como estirpes referência, apresentando alta similaridade com as bactérias de Jurema Preta por meio da análise de agrupamento do 16S rRNA, como por exemplo, *Paraburkholderia phenoliruptrix*, *P. diazotrophica* e *P. piptadeniae*.

Atualmente são conhecidas treze espécies de *Paraburkholderia* que efetivamente são capazes de nodular leguminosas, sendo elas: *P. tuberum*, *P. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), *P. phenoliruptrix* (COENYE et al., 2004), *P. mimosarum* (CHEN et al., 2006), *P. nodosa* (CHEN et al., 2007), *P. sabiae* (CHEN et al., 2008), *P. symbiotica* (SHEU et al., 2012), *P. rhynchosiae*, *P. sprentiae* (de MEYER et al., 2013), *P. diazotrophica* (SHEU et al., 2013), *P. dilworthii* (de MEYER et al., 2014), *P. caballeronis* (MARTINEZ-AGUILAR et al., 2014) e *P. aspalathi* (MAVENGERE et al., 2014). Os principais gêneros de plantas hospedeiras dessas *Paraburkholderia* são espécies de *Mimosa* e *Piptadenia* (BONSTEMPS et al., 2010; BOURNAUD et al., 2013). Brocardo et al. (2015), isolaram bactérias de nódulos de *Mimosa scabrella* (Benth) e por meio da análise do 16S rRNA encontraram o gênero *Paraburkholderia* entre os mais frequentes dentre os isolados. Em um trabalho similar, Dall'Agnol et al. (2016), testaram a capacidade de algumas estirpes em nodular *M. caesalpiniiifolia* e todas as bactérias classificadas como *Paraburkholderia* foram positivas para nodulação, ao contrário das cepas de *Rhizobium*. O gênero *Paraburkholderia nodosa* também foi isolado de outras espécies de *Mimosa*, como *Mimosa scabrella* e *M. bimucronata* (CHEN et al., 2005).

Castro et al. (2017), isolaram uma diversidade de bactérias de feijão-caupi e a análise do 16S rRNA revelou estirpes pertencentes a diversos gêneros, incluindo *Paraburkholderia*. No entanto, não houve nesse estudo uma avaliação sobre a eficiência simbiótica desses isolados, inviabilizando a possibilidade de fazer levantamentos a respeito da efetividade dessas estirpes na fixação de nitrogênio.

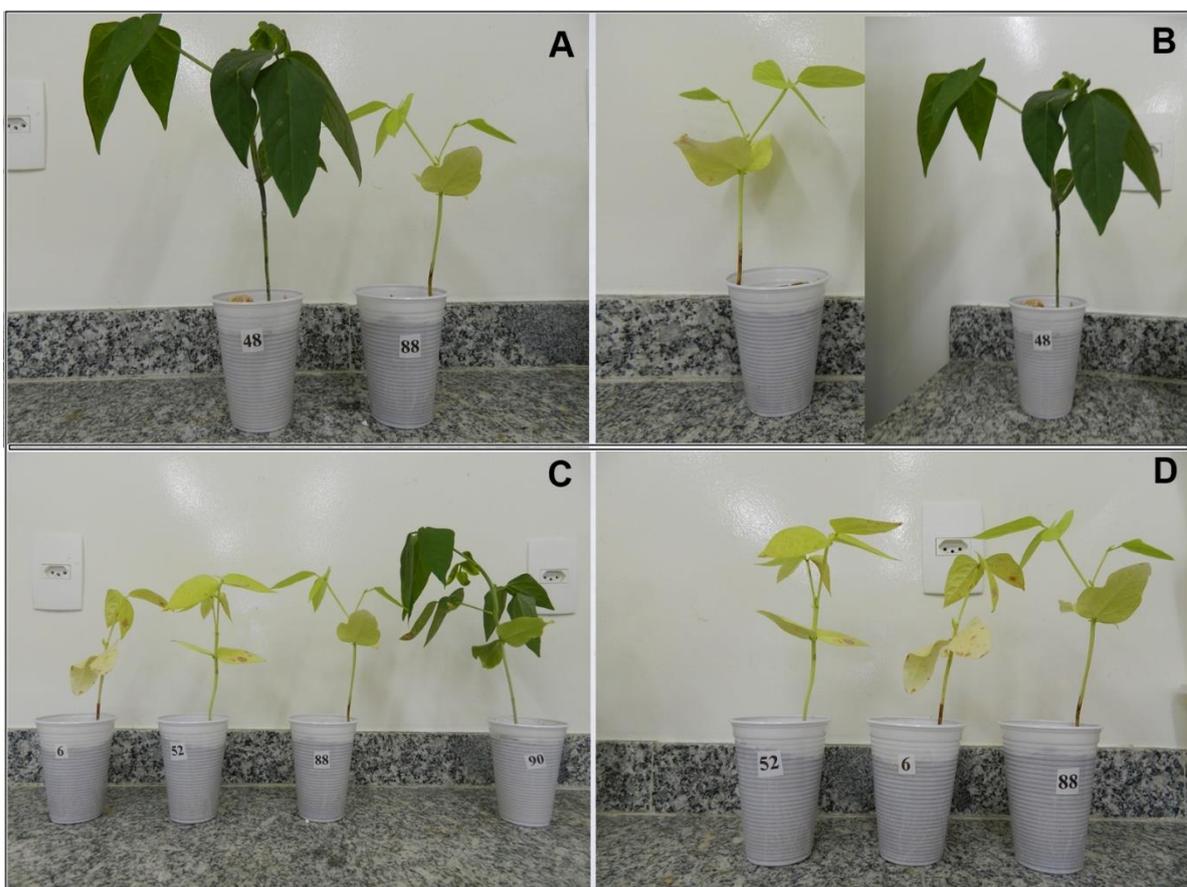
No caso da coleção de bactérias avaliadas no presente estudo, os resultados sugerem que a habilidade de associação dessas estirpes classificadas como *Paraburkholderia* estaria intimamente relacionada com espécies de *Mimosa* sp. como hospedeiro central, e por não ser o feijão-caupi seu simbiote principal, não foi possível então verificar o estabelecimento de relações simbióticas entre microrganismo x planta e a consequente formação de nódulos.

A nodulação, produção de massa de matéria seca da parte aérea e acúmulo de nitrogênio na parte aérea constituem importantes parâmetros no processo de seleção de estirpes e na recomendação de inoculantes (COSTA et al., 2013). A massa de matéria seca da parte aérea (MPAS) e da raiz (MRS) referentes aos tratamentos inoculados com a BR 3267, foi superior aos valores das demais bactérias avaliadas, além de ter sido a única bactéria positiva para a formação de nódulos. Esse resultado corrobora com fato dessa estirpe possuir eficiência agrônômica comprovada e recomendada como inoculante para a cultura do feijão caupi (LEITE et al., 2017). Em relação à produção de massa de matéria seca da parte aérea e da raiz dos demais tratamentos, observou-se valores bem inferiores comparados com a estirpe de referência (fig 5). Isso pode ser justificado devido à deficiência de N ao qual essas plantas estiveram submetidas no decorrer do experimento. De acordo com Silva et al. (2010), o nitrogênio é um nutriente essencial para desenvolvimento das plantas, isto é, na sua ausência, variáveis como número de folhas, a altura, o diâmetro do caule e a área foliar das plantas são afetadas negativamente.

No entanto, apesar de não ter sido observada a formação de nódulos entre as bactérias avaliadas e o feijão-caupi, alguns isolados, por exemplo, 1697, 16102 e 1691, induziram um aumento na parte aérea das plantas quando comparadas à testemunha absoluta (Tabela 4). Esse fator pode ser interpretado como um indicativo de capacidade de promoção de crescimento vegetal dessas estirpes.

É importante ressaltar que os resultados obtidos no experimento de eficiência simbiótica são ainda preliminares. Existe a possibilidade de que os isolados que não formaram nódulos em *Vigna unguiculata* possam nodular plantas hospedeiras promíscuas como *Phaseolus vulgaris* (Dall'Agnol et al., 2016), *Mimosa pudica*, *Mimosa cordistipula* (Lemaire et al., 2015; Sheu et al., 2012), e ainda seu próprio hospedeiro original *Mimosa tenuiflora* (Willd.). Contudo, para testar essas hipóteses, ensaios complementares futuros se fazem necessários.

Figura 5. Avaliação da eficiência simbiótica de estirpes de *Jurema* preta em Feijão-caupi. Tratamentos inoculados com os isolados: (A) BR3267 e 1690; (B) 16119 e BR3267; (C) 1694, 16101, 16105 e BR3267; (D) 16111, 16100 e 1692.



FONTE: PRÓPRIO AUTOR

Tabela 3. Produção de massa de parte aérea seca (MPAS), massa de raiz seca (MRS), massa seca total (MTS) obtidos no ensaio de nodulação da Jurema Preta

TRATAMENTO	GÊNERO	MPAS	MRS	MTS
		G PLANTA ⁻¹	G PLANTA ⁻¹	G PLANTA ⁻¹
16104	<i>Rhizobium</i>	0,823 c	0,350 c	1,173 b
16101	<i>Paraburkholderia</i>	0,481 d	0,210 c	0,692 b
16110	<i>Paraburkholderia</i>	0,681 d	0,348 c	1,030 b
16103	***	0,583 d	0,463 c	1,047 b
1691	<i>Paraburkholderia</i>	0,851 c	0,548 c	1,140 b
16109	<i>Paraburkholderia</i>	0,752 d	0,458 c	1,210 b
1692	<i>Paraburkholderia</i>	0,562 d	0,255 c	0,818 b
1693	<i>Paraburkholderia</i>	0,795 c	0,441 c	1,236 b
1697	***	1,07 c	0,585 c	1,656 b
16102	***	1,19 c	0,623 c	1810 b
16106	***	0,659 d	0,272 c	0,931 b
16115	***	0,720 d	0,379 c	1,099 b
16121	<i>Paraburkholderia</i>	0,640 d	0,271 c	0,911 b
16119	<i>Paraburkholderia</i>	0,600 d	0,340 c	0,941 b
1689	***	0,837 c	0,401 c	1,238 b
16116	<i>Paraburkholderia</i>	0,694 d	0,386 c	1,080 b
1695	<i>Rhizobium</i>	0,725 d	0,403 c	1,128 b
16100	<i>Paraburkholderia</i>	0,676 d	0,402 c	1,079 b
1694	***	0,804 c	0,426 c	1,231 b
1699	<i>Paraburkholderia</i>	0,559 d	0,383 c	0,943 b
16111	<i>Paraburkholderia</i>	0,754 c	0,295 c	1,049 b
1698	***	0,836 c	0,327 c	1,164 b
1690	<i>Paraburkholderia</i>	0,790 c	0,384 c	1,174 b
16108	***	0,596 d	0,285 c	0,881 b
16120	<i>Paraburkholderia</i>	0,693 d	0,335 c	1,028 b
16107	<i>Paraburkholderia</i>	0,684 d	0,380 c	1,064 b
16112	***	0,696 d	0,447 c	1,144 b
16105	<i>Paraburkholderia</i>	0,838 c	0,475 c	1,313 b
TEST ABS		0,716 d	0,350 c	1,066 b
TEST N		2,64 a	1,82 a	4,035 a
BR 3267		2,09 b	1,26 b	3,35 a
CV (%)		11,89	17,79	13,57

** Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável não diferem pelo teste Scott-Knot a 5% ($p < 0,5$).

6 CONCLUSÕES

Os isolados de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw. DC) avaliados quanto à sequência do gene 16S rRNA, revelaram estirpes pertencentes a gêneros bacterianos não nodulantes de leguminosas, justificando a não continuação do seu estudo.

Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio, associadas a plantas de Jurema Preta cultivadas em diferentes solos de Pernambuco, apresentaram elevada variabilidade genética pela técnica de BOX-PCR.

Os isolados de Jurema Preta (*Mimosa Tenuiflora* (Willd.) avaliados quanto ao gene 16S rRNA pertencem em sua maioria (89,47%) ao gênero *Paraburkholderia* e apenas 10,53% foram associados a *Rhizobium*, ambos conhecidos como gêneros fixadores de nitrogênio em leguminosas.

Os isolados de Jurema Preta avaliados quanto ao desempenho simbiótico, não apresentaram eficiência na nodulação e fixação de N₂ em feijão-caupi, sob condições estéreis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE de, L.A.; FABRICANTE, J.R.; de OLIVEIRA, F.X. Invasão biológica por *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.: impactos sobre a diversidade e a estrutura do componente arbustivo-arbóreo da caatinga no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta bot. bras.** 23(4): 935-943. 2009.

ARAÚJO FILHO, J.A; CRISPIM, S.M.A. Pastoreio Combinado de Bovinos, Caprinos e Ovinos em Áreas de Caatinga no Nordeste do Brasil. In: Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte, 1., 2002, Corumbá. Anais... Corumbá: Embrapa Pantanal; Concórdia: Universidade de Contestado, 2002.

AGUILA, P.C.M. Agricultura en zonas áridas y semiáridas. **Arid Zones Agriculture Journal**, Idesia, Arica, v. 31, n. 2, p. 3-4, jun. 2013.

ALAVI, P.; STARCHER, M.R.; THALLINGER, G.G.; ZACHOW, C.; MULLER, H.; BERG, G. Stenotrophomonas comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. **BMC Genomics**, v.15, p. 482, 2014.

ALBUQUERQUE, H.C.; PEGORARO, R.F.; VIEIRA, N.B.B.; de JESUS FERREIRA AMORIM, I.; KONDO, M.K. Capacidade nodulatória e características agronômicas de feijoeiro comum submetidos à adubação molibídica parcelada e nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.2, p.214-221, 2012.

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, F. L. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurgéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revistas Brasileiras de Ciências Agrárias**, v. 5, p. 364-369, 2010.

ARAÚJO FILHO, J. A. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. Recife, PE: Projeto Dom Helder Câmara, 2013. 200p.

ARAÚJO, F. F.; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S.; CRESTE, J. E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2007.

ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 21-43.

APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. **Banco de dados LPN**. Disponível em: <www.cnip.org.br>. Acesso em: 29 jun. 2018.

AZANI et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**. vol. 66(1). p. 44-77, 2017.

BALA, A, MURPHY., GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p. 917-930. 2003.

Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p 549-79, 2005.

BARBOSA, T. R. L.; SOARES, M. P.; BARROSO, D. G. **Plantio do sabiazeiro (*Mimosa caesalpinifolia*) em pequenas e médias propriedades**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008.

BARBOSA, J.Z; CONSALTER, R; VARGAS MOTTA, A.C. Fixação Biológica de Nitrogênio em Poaceae. **Evidência**, Joaçaba v. 12 n. 1, p. 7-18, janeiro/junho 2012.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**, 2008, 63f. Dissertação de Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Arido. Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

BONTEMPS, C. et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes, **Molecular Ecology**, n. 9, p. 44-52, 2010.

BOURNAUD, C. et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe mimoseae), **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M. F.; MOULIN, L.; ELLIOTT, G. N.; DIDIER, L. L.; SILVA, C.; GREYER, R.; RICALDE, S. L. C.; CHEN, W.; PPRENT, J. I.; ROMERO, E. M. I.; YOUNG, J. P. W. & JAMES, E. K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alpha proteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, p. 319–333, 2015.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-215, 2011.

BROCARD, N.C.M.E.; STOCCO, P.; TRAMONTIM, A.L; FILHO, L.C.I.O; SANTOS, J.C.P. Diversidade Cultural morfológica e genética de diazotróficos isolados de nódulos de bacatinga. **Revista Árvore**. V.39, n.5, p.923-933, 2015.

CADETE, L.L.; de FARIAS, A.R.B.; RAMOS, A.P.S.; da COSTA, D.P.; FREIRE, F.J.; SOBRAL, J.K. Genetic variability of sugarcane-associated diazotrophic bacteria capable of inorganic phosphate solubilizing. **Bioscience Journal**., Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 122-129, Mar. 2012.

CAMPANHA, M.M. Árvores e arbustos do sistema agrossilvopastoril Caprinos e Ovinos. **Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos**, 32p. 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Sabiá, *Mimosa caesalpinifolia***. Embrapa Florestas, 2007. 10p. (Circular Técnica 135).

CASTRO, A.S. & CAVALCANTE, A. **Flores da caatinga**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011. 116p.

CASTRO de J.L.; SOUZA, M.G.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A.A.; RODRIGUES, T.L.; MOREIRA, F.M.S. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining áreas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 41:e0160525. 2017.

CHEN, W.M. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W.M.; de FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.Y.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p. 1055–1059, 2007.

CHEN, W. M. et al. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2174-2179, 2008.

COENYE, T. HENRY, D.; SPEET, D.P.; VANDAMME, P. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 623-627, 2004.

DEMARTELAERE, A.C.F.; OLIVEIRA, A.K.; GOÉS, G.B.; LIMA, G.K.L.; PEREIRA, M.F.S. A flora apícola no semi - árido brasileiro. **Revisão literária**. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v. 5, n. 1, p. 17 – 22, 2010.

COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; de CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L.V.M.; MOREIRA, F.M.S. Promoção de crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.9, p.1275-1284, set. 2013.

DALL'AGNOL, R.F.D. DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; HUNGRIA, M. **Diversidade e filogenia de estirpes de *Rhizobium* pela metodologia de MLSA**. Maceió-AL: Fertbio, 2012.

DALL'AGNOL, R.F.D.; PLOTTEGHER, F.; SOUZA, R.C.; MENDES, I.C.; JUNIOR, F.B.R.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, 2016, Vol. 92, n. 8.

DALL'AGNOL, R.F.D.; BOURNAUD, C.; FARIA, S.M, BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, 2017, Vol. 93, n. 4.

DEMARTELAERE, A.C.F.; OLIVEIRA, A.K.; GOÉS, G.B.; LIMA, G.K.L.; PEREIRA, M.F.S. A flora apícola no semi - árido brasileiro. Revisão literária. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v. 5, n. 1, p. 17 – 22, 2010.

DOBRTSA AP, SAMADPOUR M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 2016, DOI: 10.1099/ijsem.0.001065.

DRUMOND, M. A.; RIBASKI, J.; SÁ, I. B.; NASCIMENTO, C. E. S.; OLIVEIRA, V. R. Espécies arbóreas exóticas de uso múltiplo para o Semiárido brasileiro. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. (Ed.). Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, cap. 7, p. 243-274, 2010.

ELLIOTT GN, CHOU J-H, CHEN WM, BLOEMBERG GV, BONTEMPS C, MARTÍNEZ-ROMERO E, VELÁZQUEZ E, YOUNG JPW, SPRENT JI, JAMES EK. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environ Microbiol** 11:762–778. 2009.

Estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.305-316, 2001.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 908-920, 2003.

FERNANDES JUNIOR, P.I. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.]**. 2009,183f. Tese de Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo, UFRJ, Brasil.

FERREIRA, D.F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n.2, p. 36-41, 2008.

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia* [em linea] 2007, 66 [Fecha de consulta: 1 de agosto de 2018] disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90866317>.

GARAU, G.; YATES, R.J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 125–134, 2009.

GRAÇAS, J. P. et al. **Microrganismos estimulantes na agricultura**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2015. 61 p. (Série produtor rural nº59).

GEHLOT, H. S.; TAK, N.; KAUSHIK, M.; MITRA, S.; CHEN, W. M.; POWELEIT, N.; PANWAR, D.; POONAR, N.; PARIHAR, R.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; OJHA, A.; RAO, S. R.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; PERIGOLO, N.; TRIPATHI, A. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. & GYANESHWAR, P. An invasive Mimosa in India does not adopt the symbiont of its native relatives. **Annals of Botany**, v. 112, n. 1, p. 1-18, 2013.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, Y. 2004. Rhizobium, Bradyrhizobium and Agrobacterium strains isolated from cultivated legumes. **Biol. Fertil. Soils**, 39:179-185.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HAUFF, S.N. Representatividade dos ecossistemas da Caatinga nas Áreas Prioritárias e Unidades de Conservação. Relatório ao PNUD - PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO PROJETO BRA/00/021: Sustentabilidade e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade, 2010.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant soil**, v.311, p. 1-18. 2008.

HOWARD, J.B.; KECHRIS, K.J.; REES, D.C; GLAZER, A.N. Multiple Amino Acid Sequence Alignment Nitrogenase Component. **Insights into Phylogenetics and Structure-Function Relationships**, v. 8 (9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072751>. 2013.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J.R.; MENDES, L.C. **Fixação biológica no nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa soja, 48p. (Embrapa soja, Circular Técnica, 35) 2001.

JUNIOR, J.C.B.D.; MUIR, J.P.; APOLINÁRIO, V.X.O.; NAIR, P.K.R.; LIRA, M.A.; SOLLENBERGER, L.E. Tree legumes: an underexploited resource in warm-climate silvopastures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.46(8), p.689-703, 2017.

KAUR, G.; SINGH, B.P.; NAGPAL, A.K. Phenology of Some Phanerogams (Trees and Shrubs) of Northwestern Punjab, India. **Journal of Botany**, v. 2013, 10p. 2013.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. 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.

LEITE, K.; FISCHER, D.; ROUWS, L.F.M.; JUNIOR, P.I.F.; HOFMANN, A.; KUBLIK, S.; SCHLOTTER, M.; XAVIER, G, R.; RADL, V. Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.2064, jan 2017.

LEMAIRE B, DLODLO O, CHIMPHANGO S, STIRTON C, SCHRIRE B, BOATWRIGHT JS, HONNAY O, SMETS E, SPRENT J, JAMES EK, MUASYA AM. Symbiotic diversity, specificity, and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). **FEMS Microbiol Ecol** 91:1–17, 2015.

LEMAIRE B, CHIMPHANGO S, STIRTON C, RAFUDEEN S, HONNAY O, SMETS E, CHEN W-M, SPRENT J, JAMES EK, MUASYA AM. Biogeographical patterns of legume-nodulating Paraburkholderia: from African Fynbos to continental scales. **Appl Environ Microbiol** 82:5099–5115, 2016.

LEMAIRE B, DLODLO O, CHIMPHANGO S et al. Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). **FEMS Microbial Ecology** 2015; **91**:1–17.

LEWIS, G.P. & RICO ARCE, L. 2005. Tribe Ingeae. In G. Lewis; B. Schrire; B. Mackinder & M. Lock (eds.) **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, p. 193-213.

LIMA et al. 2014. Fabaceae. In R.C. Forzza et al. (eds.) **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>). Acesso em: 26. set.2017.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R. Leucena (*Leucaena leucocephala*). **Boletim de extensão**. UFLA - Lavras - MG, 2006. Disponível em http://editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_64.pdf Acesso em 2017.

LIU WYY, RIDGWAY HJ, JAMES TK et al. Burkholderia sp. Induces functional nodules on the South African invasive legume *Dipogon lignosus* (*Phaseoleae*) in New Zealand soils. **Microbial Ecology**, v. 68, p. 542–55, 2014.

LIU, X.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X.; ZAGAR, C.; XIA, L. G.; DONG, X. & WANG, Y. P. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 417-426, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Editora Artmed, Martins PGS, Lira Junior MA, Fracetto GGM, da Silva MLRB, Vincentin RP, de Lyra M do CCP. 2015. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Arch Microbiol** [Internet]. 197:459–469.

MARIN VA, BALDANI VLD, TEIXEIRA KRS, BALDANI JI 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf Acessado em 15/05/2017.

MAIA, G. N. Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.

MAIA, G. N. 2012. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. (2 ed). Fortaleza: Printcola Gráfica e Editora, 413p.

MARTINS, P.G.S.; JUNIOR, M.A.L.; FRACETTO, G.G.M.; DA SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R.P.; DE LYRA, M. do C.C.P. Mimosa caesalpinifolia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiololy**, v. 197, p. 459-469. 2015.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L. et al. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1063-1071, 2014.

MARTINS, L. M. V. et al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”**. Comunicado Técnico: EMBRAPA, n. 19, 1997, 14 p.669-681, 2016.

MATTAR, E.P.L.; BARROS, T.T.V.; BENJAMIN, B.C.; SOUZA, J.F.; SILVA, A.M.C. Federal Conservation Units in Brazil: The Situation of Biomes and Regions. **Floresta e Ambiente**, v.25(2), 2018.

MAVENGERE, N. R.; ELLIS, A. G.; LE ROUX, J. J. *Burkholderia aspalathi* sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume *Aspalathus abietina* Thunb. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 64, p. 1906-1912, 2014.

MEDEIROS, E.V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

MELLONI, R. et al. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 30, p. 235-246, 2006.

MELO, I.S de; AZEVEDO, J.L. de. Ed. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, 2009. No prelo.

MENEZES, K.A.S.; NUNES, G.FO.; SAMPAIO, A.A; SILVA, A.F.; SOUZA, L.S.B; GAVA, C.A.T.; MARTINS, L.M.V.; FERNANDES JUNIOR, P.I. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the dry forest Caatinga (Northeastern, Brazil). **Revista de Ciências Agrárias**, 39. Doi:10.19084/RCA15050.2016.

MENEZES, K.A.S. Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas cultivadas em solos do semiárido. 74f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada – Mestrado (PPHI) – **Universidade do Estado da Bahia**, Juazeiro, 2013.

de MEYER S.E; CNOCKAERT M; ARDLEY J.K; WYK, B.E.V; VANDAMME, P.A; HOWIESON, J.G. Burkholderia spreintiae sp. nov., isolated from Lebeckia ambigua root nodules. **Int J Syst Evol Micr**, v 63:3950–7.2014.

MISHRA, R. K.; PANDEY, B. K.; PATHAK, N. ; ZEESHAN, M. 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**, January 2015, Vol.4(1), pp.25-32.

MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora da UFLA, 726p. 2006.

MOREIRA, F.M.S.; PEREIRA, E.G. 2001. Microsymbionts: rhizobia. In: Swift, M.; Bignell, D. (Ed.). Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practices. **ICRAF**, Bogor, Indonésia. p. 19-24.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, n 2., p. 74-99, 2010.

MORETZSOHN, M.C.; GOUVEIRA E.G.; INGLIS, P.W.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; VALLS, J.F.M.; BERTIOLI, D.J, A Study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. **Ann. Bot.** V.111, p. 113-126, 2013.

MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. **Applied Soil Ecology**, v. 64, n. 0, p. 201-213, 2// 2013.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, G. Ecologia de Bactérias Diazotróficas de Solos Tropicais. In: **Ecologia Microbiana**. Eds. Melo, I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, EMBRAPA – CNPMA. 1998. p. 15-60.

NOGUEIRA, N.O.; OLIVEIRA, O.M. de.; MARTINS, C.A.D.A S.; BERNARDES, C. DE O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia**, v.8, n.14, p.2121. 2012.

NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume Bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (ed). Tropical Pasture Research – Principles and Methods. Hurley: common wealt bureau of pastures and field crops. p. 134-174. (bulletin, 51). 1976.

OLIVEIRA, A. F. C. J.; OLIVEIRA, A. D.; DE OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

OLIVEIRA, N.C.P. Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados.2010, 80f. **Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical. Universidade Federal de Goiás**, UFG, Brasil.

OREN, A.; GARRITY, G.M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 2015; **65**:2028–9.

OURARHI, M.; ABDELMOUMEN, H.; GUERROUJ, K.; BENATA, H, MURESU, R.; SQUARTINI, A.; EL IDRISSE, M. M. 2011. *Colutea arborescens* is nodulated by diverse rhizobia in Eastern Morocco. **Archives of Microbiology**. 2:115-24.

PASSARI, A.K.; MISHRA, V.K.; GUPTA, V.K.; YADAV, M.K.; SAIKIA, R.; SINGH, BP. In Vitro and In Vivo Plant Growth Promoting Activities and DNA Fingerprinting of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Associates with Medicinal Plants. **PLOS ONE**. 10(9):1-18. 2015.

PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 3–8, 1998.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, J.E. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.34, p.17-42. 2015.

PEREIRA, P.M. Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (Box-PCR e 16S rRNA) e na metodologia de MLSA. 101f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – **Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, 2008.

PIRES, R.C.; JUNIOR, F.B.R, ZILLI, J.E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E.K.; SIMON, M.F. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant Soil**. 423: p. 411-428, 2018.

POLY, F. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v152, p.95-103, 2001.

PORTO, E. R. **O Semi-Árido Brasileiro**: quem me dera ter um! 2002. <cpatsaembrapa.br/artigos/semiario.html> Acesso em 26 out, 2017.

PRESTES, M. T. **Efeitos de diferentes doses de esterco de gado, no desenvolvimento e no balanço nutricional de mudas de angico (*Anadenanthera macrocarpa*)**. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

QUEIROZ, L. P. 2009. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana, UEFS. 443 p. 64 REIS JÚNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R. ; YOUNG, J. P. W. ; SPRENT, J. I. ; JAMES, E. K. 2010. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, 186: 934-946.

QUEIROZ, L. P. Flowering plants of the Brazilian semi-arid. In: QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A. & GIULIETTI, A. M. (eds.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. p. 49-53, 2006.

REBECA F. DALL'AGNOL; F' ABIO PLOTTEGHER; RENATA C. SOUZA; IÊDA C. MENDES; FÁBIO B. DOS REIS JUNIOR; GILLES B'ENA; LIONEL MOULIN; AND MARIANGELA HUNGRIA: *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **Microbiology Ecology**, 92, 2016.

REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2002.

RESENDE, A.V. E KONDO, M.K. 2001. Leguminosas e recuperação de áreas degradadas. **Informe Agropecuário 22** (210):46-56.

RIBASKI, J. et al. Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de uso múltiplo para a Região Semiárida Brasileira. **Comunicado Técnico 240**, EMBRAPA FLORESTAIS – Colombo, PR, 2009.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. L.; OLIVEIRA, V. R.; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 4p. (Comunicado técnico, 104).

RIBASKI, J.; DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; NASCIMENTO, C. E. S. Algaroba (*Prosopis juliflora*): **Árvore de Uso Múltiplo para a Região Semiárida Brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas. 8p. Comunicado técnico, 240, 2009.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multi Locus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.

RODRIGUES, A.A; FORZANI, M.V; SOARES, R.S; SIBOV, S.T; VIEIRA, J.D.G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesq. Agropecuária**. Trop. Vol 46 nº 2. Goiânia Apr. /June 2016.

RODRIGUES, D. R. Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativa. 2016. 79f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - PPGCA) - **Universidade Estadual da Paraíba**, Campina Grande, 2016.

SANTOS, E.M.; ALMEIDA, G.V.L.; OLIVEIRA, L.L.D.S.S.; MENESES, E.R.A.; GUEDES, M.V.; SACRAMENTO, A.C.; BEZERRA, G.S.C.L.; BRITO, J.V.A. & SANTOS, J.C. O Parque Estadual Mata da Pimenteira - Primeira Unidade de Conservação Estadual na Caatinga de Pernambuco. In: SANTOS, E.M.; MELO JÚNIOR, M.; CAVALCANTI, J.S.S. & ALMEIDA, G.V.L. (orgs.). **Parque estadual mata da pimenteira: riqueza natural e conservação da caatinga**. Recife: Editora da UFRPE, 2013. 268p.

SANTOS, P.E; PALMER, M.; RAMÍREZ, B.C.; BEUKES, C.; STEENKAMP, E.T. et al. Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia sensu lato* Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae. **Genes**, 9, 389. 2018.

SCHISTEK, H. “Como conviver com o semi-árido”. In Caritas Brasileira, Comissão Pastoral da Terra, FIAN. **Água de chuva – o segredo de convivência com o semi-árido**. São Paulo, Paulinas, p, 104. 2001.

SHEU, S.I.; CHOU, J.H.; BONSTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; JAMES, K.E.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2012), v.62, 2272–2278.

SHEU, S. Y; CHOU, J. H.; BONSTEMPS, C.; GEOFFREY, E. N.; GROSS, E.; REIS JUNIOR, F. B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; CHEN, W. M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 435-441, 2013.

SILVA JÚNIOR, E.B.; FERREIRA, A.; BODDEY, M.R.; ZILLI, J.E. & XAVIER, G.R. Ontogenia da nodulação de feijão-caupi em vaso com solo da área de produção do Centro-Oeste. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi. Recife. **Anais...** Recife: IPA, 2013.

SILVA JUNIOR, E. B.; SILVA, K.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, P. J.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 804-812, 2014.

SILVA, A. F. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga. Recife: UFRPE, 2015. 99p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia: Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015.

SILVA VC, ALVES PAC, RHEM MFK, DOS SANTOS JMF, JAMES EK, GROSS E. Brazilian species of *Calliandra* Benth. (tribe Ingeae) are nodulated by diverse strains of *Paraburkholderia*. **Syst Appl Microbiol** :1–10, 2018.

SILVA, C.G.M.; MELO FILHO, A.B.; PIRES, E.F.; STAMFORD, T.L.M. Physicochemical and microbiological characterization of mesquite flour (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(4): 733-736, out.-dez, 2007.

SILVA, J.M.C; TABARELLI, M; FONSECA, M.T; LINS, L.V. Biodiversidade e Conservação da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. – Brasília, DF: **Ministério do Meio Ambiente**: Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SILVA, J.M.C.; M.A. SOUZA; A.G.D. BIEBER; C.J. CARLOS. Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. pp. 237-273. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.

SISTI, C.P.J.; SANTOS, H.P.; KOCHHANN, R.A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; STEPKOWSKI.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA,K.; MOULIN,L. The Variable Part of the *dnak* Gene as an Alternative Marker for Phylogenetic Studies of Rhizobia and Related Alpha *Proteobacteria*. **Systematic and. Applied. Microbiology**, v.26, 2003.

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 37, p. 473–491, 1999.

SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, a, v.42, n.2, p.207-217, fev, 2007.

SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 937-947, 2008.

SPIPKER, T; BALDWIN, A; BUMFORD, A.; DOWNSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **J Clin Microbiol**, v, 47: 2607–2610, 2009.

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.

STEPKOWSKI, T.; CZAPLÍNSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The Variable Part of the *dnaK* Gene as an Alternative Marker for Phylogenetic Studies of Rhizobia and Related Alpha *Proteobacteria*. **System. Appl. Microbiol**, v.26, p. 483–494, 2003.

STOPNISEK, N.; BODENHAUSEN, N.; FREY, B.; FIERER, N.; EBERL, L.; WEISSKOPF, L. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil Burkholderia populations. **Environ Microbiol** 16:1503–1512, 2004.

STROBEL, G.A & DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biologic Review** 67: 491-502, 2003.

SUÁREZ, M.Z.R.; CABALLERO, M.J.; COUTINHO, B.G.; MENDONCA, P.L.; JAMES, E.K.; VENTURI, V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. **Microb Ecol** 63:249–266, 2012.

TAMURA, K; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p.2725-2729, 2013.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Characterization of rhizobia indicated for inoculant production using 16S rRNA partial sequencing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.4, p.384-391, abr, 2009.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.305-316, 2001.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de Tringe SG e Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Curr Opin Microbiol**, 11(5), p. 442-446, 2008.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 442–446, 2008.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.507 - 512, 2002.

VANDAMME, P.; BRANDT E.; HOUF K.; SALLES J. F.; VAN ELSAS, J. D.; SPILKER, T.; LIPUMA, J. J. Burkholderia humi sp. nov., Burkholderia choica sp. nov., Burkholderia telluris sp. nov., Burkholderia terrestris sp. nov. and Burkholderia udeis sp. nov.: Burkholderia glathei-like bacteria from soil and rhizosphere soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. 63:4707–4718, 2014.

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.

VITOUSEK P. M.; MENGE D. N. L.; REED S. C.; CLEVELAND C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Phil. Trans. R. Soc. B**. 368: 20130119, 2013.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 697-703, 1991.

WOJCIECHOWSKI M. F. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. v. 91, n. 11, p.1846-1862, 2004.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.

XAVIER, J. G.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v. 19, p. 25-33, 2006.

ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L`TAIEF, B.; EL AOUNI, M. H.; DREVON, J. J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 43, n. 1, p. 67-77, 2007.

ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y.; ZHOU, J.C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 1, p. 201-210, 2007.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P. Symbiotic efficiency of cowpea *Bradyrhizobium* strains in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

ZILLI, J. E.; SILVA NETO, M. L.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.