



UEPB

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

MARCELO ROCHA IPUCHIMA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Sinorhizobium* spp. E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ASSOCIAÇÕES BI E TRIPARTITES COM *Gliricidia sepium***

CAMPINA GRANDE – PB  
2023

**MARCELO ROCHA IPUCHIMA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Sinorhizobium* spp. E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ASSOCIAÇÕES BI E TRIPARTITES COM *Gliricidia sepium***

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

Orientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

**CAMPINA GRANDE – PB  
2023**

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

I64d Ipuhima, Marcelo Rocha.

Diversidade genética de *Sinorhizobium spp.* e eficiência simbiótica de associações bi e tripartites com *Gliciridia sepium* [manuscrito] / Marcelo Rocha Ipuhima. - 2023.

75 p. : il. colorido.

Digitado.

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

"Orientação : Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA. "

1. Glicirídia. 2. Fixação biológica. 3. Agricultura familiar. I.

Título

21. ed. CDD 635

**MARCELO ROCHA IPUCHIMA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Sinorhizobium* spp. E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ASSOCIAÇÕES BI E TRIPARTITES COM *Gliricidia sepium***

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

Aprovado em: 19/10/2023

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior – EMBRAPA Semiárido  
Orientador



---

Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Menezes – UEPB  
Membro interno



---

Dr. Jakson Leite - IFPA  
Membro externo

À minha família, em especial meus pais, irmãos e sobrinhos por todo amor e apoio para a realização dos meus sonhos. Aos meus grandes e sinceros amigos pelo carinho e incentivo.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força que me sustenta. Por me guiar, me da sabedoria e permitir a concretização desse sonho.

À minha mãe, Neura Rocha por ser o maior motivo da realização deste, dos que já foram e dos projetos que ainda virão.

Ao meu pai, José Ipuchima Filho por sempre estar ao meu lado me apoiando.

Aos meus irmãos, Marcel Rocha, Neurilene Rocha, Maicon Rodrigues, Ricardo Ramires e Henrique Araújo por todo carinho, e em especial a minha irmã Gislene Rocha pela confiança e total apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior pelos ensinamentos e execução deste estudo.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia do Solo, em especial Viviane Siqueira, nossa técnica que se empenha ao máximo em todas as atividades, e a pós doc Paula Rose, pelo seu vasto conhecimento compartilhado. E aos demais e não menos importantes Jonhattan Santos, Anderson Vasconcelos, Geovane Damaceno, Raíra Carine, Iracema Paiva, Crislaine Soares, Iara Monique Andrade e Sheiça Coelho que participaram ativamente e contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao técnico do laboratório de Controle Biológico, Herbert Mouse, por todo o apoio em diversas atividades.

A toda família do meu amigo Luciano Mendes, em especial dona Socorro Mendes, Raimundo, Raíssa, Rodolfo e Nicole por terem me acolhido em seu lar, assim que cheguei à cidade de Petrolina, recebendo-me com toda generosidade e carinho. Sou e sempre serei eternamente grato.

Aos meus grandes e estimados amigos do meu estado Amazonas Frâncio Costa, Bruno Rodrigues, Heva Eufrázio, Mayara Oliveira, Moises Fermin, Dirceu Gonçalves, Felipe Sanches, Pricila Peixoto, Adolfo Lucas, Geremias Oliveira e Allef Hwansi que sempre me apoiam e vibram a cada novo sonho concretizado.

Ao meu eterno amigo Samuel Reis e sua mãe Raimunda Seabra, por todo carinho, ajuda e acolhimento nos momentos que mais necessitei.

Aos meus tios Raimunda Rocha, Simone Maia, Alcileide Bertoldo e André, e aos meus primos Luciana Rocha e Thais Bertoldo, por todo acolhimento e carinho.

Aos meus amigos Francisneto Landim, Isabela Maria e Ruan Reis, pessoas maravilhosas que a vida me presenteou.

As minhas queridas amigas da turma do mestrado, e em especial Andreza Lúcio, por seu imenso carinho e por me receber em seu lar quando precisei.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Agrárias da UEPB.

À Embrapa Semiárido, por toda estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

A Capes pela concessão de bolsa.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este projeto fosse executado e concluído.

Muito obrigado!

## RESUMO

A *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. é uma leguminosa arbórea de grande interesse comercial e econômico para regiões tropicais. É uma espécie que tem adaptabilidade a uma grande variedade de solos, entretanto limitações nutricionais podem reduzir o seu desenvolvimento, dentre eles o nitrogênio é o que mais comumente causa essa limitação, sendo a fixação biológica de nitrogênio o método mais importante de fornecimento de nitrogênio ao sistema. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica da coinoculação de estirpes de *Sinorhizobium* com duas estirpes de *Rhizobium* (BR 8801 e BR 8802) em *Gliricidia sepium*. A avaliação das relações filogenéticas dos isolados rizobianos foi realizada por meio do sequenciamento dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* e gene constitutivo *gyrB*. Foram avaliadas 11 estirpes pertencentes ao gênero *Sinorhizobium* coinoculadas com duas estirpes de *Rhizobium* (BR 8801 e 8802), autorizadas pelo MAPA produção de inoculantes para a *G. sepium*, no Brasil. Para o teste de eficiência simbiótica das estirpes rizobianas foram realizados dois experimentos: o primeiro em casa de vegetação, com substrato esterilizado e o segundo em viveiro com solo não estéril. Um total de 38 tratamentos com quatro repetições em ambos os experimentos foram avaliados: inoculação única de 11 *Sinorhizobium*; inoculação única das BR 8801 e 8802; 11 *Sinorhizobium* coinoculados com *Rhizobium* (BR 8801); 11 *Sinorhizobium* coinoculados com *Rhizobium* (BR 8802), BR 8801 coinoculada com BR 8802, um tratamento controle com fornecimento de nitrogênio, fornecido com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com aplicação de 50 mg de N semanalmente e um tratamento absoluto, sem inoculação e aplicação de nitrogênio. Em ambos os experimentos foram avaliados as variáveis: massa seca da parte aérea e raiz, número de nódulos, massa seca dos nódulos, teor de nitrogênio, nitrogênio total e eficiência nodular. Este estudo mostrou que houve incongruências entre as filogenias de genes simbióticos e do gene constitutivo *gyrB*. Na filogenia do gene *gyrB* nove bactérias agruparam-se com *S. alkalisoli* e duas bactérias ficaram próximas de *S. terangaie*. No sequenciamento dos genes *nodC* e *nifH* as bactérias ficaram próximas a *S. americanum*, com indícios de uma possível transferência horizontal de genes simbióticos. Os isolados de *Sinorhizobium* spp. apresentaram potencial para promoção de crescimento de plantas de gliricídia. A coinoculação mostrou ser uma prática favorável, principalmente pela cooperação entre os isolados de *Sinorhizobium* spp. e as referências BR 8801 e 8802, com destaque para as bactérias G10, G19, G28, G44 e G49.

**Palavras-chave:** Gliricídia; MLSA; Coinoculação; Fixação biológica de Nitrogênio; Seleção de estirpes.

## ABSTRACT

*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. it is a tree legume of great commercial and economic interest in tropical regions. It is a species that is adaptable to a wide variety of soils, however nutritional limitations can reduce its development, among them nitrogen is the one that most commonly causes this limitation, with biological nitrogen fixation being the most important method of supplying nitrogen to the soil. system. Given the above, this work aimed to evaluate the symbiotic efficiency of coinoculation of *Sinorhizobium* strains with two *Rhizobium* strains (BR 8801 and BR 8802) in *Gliricidia sepium*. The evaluation of the phylogenetic relationships of the rhizobial isolates was carried out by sequencing the symbiotic genes *nodC* and *nifH* and the constitutive gene *gyrB*. 11 strains belonging to the genus *Sinorhizobium* were evaluated, coinoculated with two strains of *Rhizobium* (BR 8801 and 8802), authorized by MAPA for the production of inoculants for *G. sepium*, in Brazil. To test the symbiotic efficiency of rhizobial strains, two experiments were carried out: the first in a greenhouse, with sterilized substrate and the second in a nursery with non-sterile soil. A total of 38 treatments with four replications in both experiments were evaluated, including: single inoculation of 11 *Sinorhizobium*; single inoculation of BR 8801 and 8802; 11 *Sinorhizobium* coinoculated with *Rhizobium* (BR 8801); 11 *Sinorhizobium* coinoculated with *Rhizobium* (BR 8802), BR 8801 coinoculated with BR 8802, a control treatment with nitrogen supply, supplied with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  with application of 50 mg of N weekly and an absolute treatment, without inoculation and nitrogen application. In both experiments, the following variables were evaluated: dry mass of shoots and roots, number of nodules, dry mass of nodules, nitrogen content, total nitrogen and nodular efficiency. This study showed that there were inconsistencies between the phylogenies of symbiotic genes and the constitutive *gyrB* gene. In the phylogeny of the *gyrB* nine gene bacteria grouped with *S. alikisoli* and two bacteria were close to *S. teranga*. In the sequencing of the *nodC* and *nifH* genes, the bacteria were close to *S. americanum*, with evidence of a possible horizontal transfer of symbiotic genes. Isolates of *Sinorhizobium* spp. showed potential for promoting the growth of gliricidia plants. Coinoculation proved to be a favorable practice, mainly due to the cooperation between *Sinorhizobium* spp. isolates. and references BR 8801 and 8802, with emphasis on bacteria G10, G19, G28, G44 and G49.

**Keywords:** Gliricidia; MLSA; Coinoculation; Biological nitrogen fixation; Strain selection.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização química do solo utilizado no experimento de coinoculação no crescimento vegetal de *Gliricidia sepium*. Petrolina – PE, 2023.....31
- Tabela 2.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *gyrB* de 11 bactérias, identificadas no gênero *Sinorhizobium*, isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*).....33
- Tabela 3.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *nodC* de 11 bactérias, identificadas no gênero *Sinorhizobium*, isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*).....35
- Tabela 4.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *nifH* de 11 bactérias isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*).....36
- Tabela 5.** Valores médios para massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca nódulos (MSN), teor de N (Teor N), nitrogênio total (N total) e eficiência nodular (Ef nodular). Os tratamentos foram coinoculações e inoculações com as estirpes isoladas de nódulos de gliricídia, oriundas de diferentes solos do Semiárido Nordeste e duas estirpes referencias autorizadas pelo MAPA. Dois controles não inoculados, um com N mineral (50 mg L<sup>-1</sup>) e outro sem N mineral. Experimento em condições de solo estéril.....38
- Tabela 6.** Valores médios para massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca nódulos (MSN), teor de N (Teor N), nitrogênio total (N total) e eficiência nodular (Ef nodular). Os tratamentos foram coinoculações e inoculações com as estirpes isoladas de nódulos de gliricídia, oriundas de diferentes solos do Semiárido Nordeste e duas estirpes referencias autorizadas pelo MAPA. Dois controles não inoculados, um com N mineral (50 mg L<sup>-1</sup>) e outro sem N mineral. Experimento em condições de solo não estéril.....40

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *gyrB* de onze estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares gliricídia (*Gliricidia sepium*) e 16 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (533 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 2370<sup>T</sup> foi incluída como outgroup. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.....33

**Figura 2.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *nodC* de nove estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*) e 13 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (366 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424<sup>T</sup> foi incluída como outgroup. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos. \*Não é estirpe tipo.....34

**Figura 3.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *nifH* de nove estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*) e 12 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (179 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 2370<sup>T</sup> e *Mesorhizobium zhangyense* 23-3-2<sup>T</sup> foram incluídos como outgroups. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.....36

**Figura 4.** Análise comparativa da massa da parte aérea seca dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* = p< 0.1, \*\* = p< 0.05, \*\*\* = p< 0.05, \*\*\*\* = p< 0.001.....44

**Figura 5.** Análise comparativa da massa da raiz dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* = p< 0.1, \*\* = p< 0.05, \*\*\* = p< 0.05, \*\*\*\* = p< 0.001.....45

**Figura 6.** Análise comparativa do número de nódulos dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha

absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....46

**Figura 7.** Análise comparativa da massa seca dos nódulos dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....47

**Figura 8.** Análise comparativa do teor de nitrogênio dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....48

**Figura 9.** Análise comparativa do nitrogênio total dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....49

**Figura 10.** Análise comparativa da eficiência nodular dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....50

**Figura 11.** Análise comparativa da massa seca da parte aérea dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....52

**Figura 12.** Análise comparativa da massa seca da raiz dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....53

**Figura 13.** Análise comparativa do número de nódulos dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....54

**Figura 14.** Análise comparativa da massa seca dos nódulos dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....55

**Figura 15.** Análise comparativa do teor de nitrogênio dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....56

**Figura 16.** Análise comparativa do nitrogênio total dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....57

**Figura 17.** Análise comparativa da eficiência nodular dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$ .....58

**Figura 18.** Biplot da análise de componentes principais (PCA) realizada com os dados (todas as repetições) dos experimentos com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8801 e BR 8802, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)] em condições de solo estéril (casa de vegetação) e condições de solo não estéril (viveiro). PC1 e PC2 são os componentes principais um e dois, respectivamente.....59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Aspectos da espécie <i>Gliricídia (Gliricidia sepium)</i> .....	17
2.2 Fixação biológica de nitrogênio.....	18
2.3 O gênero <i>Sinorhizobium</i> /grupo <i>Ensifer</i> .....	20
2.4 Análise de Sequências Multilocus (MLSA) .....	22
2.5 Coinoculação.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1 Origem dos isolados bacterianos .....	26
3.2 Extração de DNA.....	26
3.3 Amplificação e sequenciamento parcial dos genes simbióticos ( <i>nodC</i> e <i>nifH</i> ) e gene constitutivo <i>gyrB</i> .....	26
3.4 Avaliação do efeito da coinoculação de <i>Sinorhizobium</i> com as estirpes referências BR 8801 e 8802 em <i>Gliricidia sepium</i> .....	28
3.4.1 Preparo dos inóculos .....	28
3.4.2 Experimento I: vasos com solo estéril .....	28
3.4.3 Experimento II: vasos com solo não estéril .....	29
3.5 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES <i>gyrB</i> , <i>nodC</i> e <i>nifH</i> .....	32
4.1.1 Sequenciamento parcial do gene constitutivo <i>gyrB</i> .....	32
4.1.2 Sequenciamento parcial do gene simbiótico <i>nodC</i> .....	33
4.1.3 Sequenciamento parcial do gene simbiótico <i>nifH</i> .....	35
4.2 Avaliação do efeito da coinoculação de <i>Sinorhizobium</i> com as estirpes referências BR 8801 e 8802 em <i>Gliricidia sepium</i> .....	37
4.2.1 Experimento I: vasos com solo estéril .....	37
4.2.2 Experimento II: vasos com solo não estéril .....	39

5. DISCUSSÃO .....	60
6. CONCLUSÃO .....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## 1. INTRODUÇÃO

A *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. é uma leguminosa arbórea originária do México e América Central que pertence à família *Fabaceae*. Apresenta ciclo perene e raízes profundas, e pode chegar a atingir de 10 a 15 metros de altura (GÓMEZ et al., 2002). Foi introduzida no Brasil na década de 70 para sombreamento das culturas de cacau no litoral baiano e na década de 80 para a alimentação animal na região semiárida do Nordeste (ANDRADE et al., 2015).

A gliricídia é uma espécie de grande interesse comercial e econômico para regiões tropicais, sendo considerada como uma planta de múltiplo uso: forragem, reflorestamento, adubação verde e cercas vivas, e demais outros (CARVALHO FILHO et al., 1997). É uma espécie tolerante a prolongados períodos de seca e tem adaptabilidade a uma grande variedade de solos, incluindo ácidos e erodidos (BEMAL, 1988).

Entretanto, limitações nutricionais podem reduzir o seu desenvolvimento, dentre eles, o nutriente que mais comumente causa essa limitação está o nitrogênio. Este nutriente é obtido, principalmente, pela decomposição da matéria orgânica no solo, adubação e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA et al., 1997), sendo a FBN o método mais importante e econômico de fornecimento deste nutriente ao sistema (SÁ E VARGAS, 1997).

A FBN é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura, e a inoculação (produtos contendo células bacterianas) de sementes de leguminosas com rizóbios é prática comum em vários países (CHAGAS JÚNIOR, 2007).

O uso de inoculantes é uma prática promissora eficiente no incremento da produtividade de leguminosas, principalmente por ser uma tecnologia de baixo custo e de impactos ambientais positivos (MARTINS et al., 2003). A utilização de rizóbios é uma peça chave para o manejo agrícola sustentável, pois proporciona as plantas uma menor dependência de fertilizantes químicos, menores custos e maiores produtividades (MOURA NETO, 2020).

Considerando os benefícios da simbiose entre os rizóbios e as leguminosas, tem-se avaliado uma técnica alternativa de inoculação, conhecida como “inoculação mista” ou “coinoculação”. A técnica é baseada na mistura de inoculantes com estirpes de microrganismos distintos, os quais produzem um efeito sinérgico, com o objetivo de obter resultados produtivos superiores, em comparação quando os mesmos são utilizados na forma isolada (BÁRBARO et al., 2008). A resposta positiva à coinoculação pode ser atribuída a uma

nodulação mais precoce, ao aumento do número de nódulos e ao melhor desenvolvimento do sistema radicular (REMANS et al., 2008).

Na literatura há diversos estudos evidenciando os benefícios da coinoculação com diferentes microrganismos, principalmente de rizóbios com as conhecidas BPCP (bactérias promotoras de crescimento em plantas) (ARAÚJO E HUNGRIA, 1999; HUNGRIA et al., 2013; ZUFFO et al., 2016; BENITO et al., 2017; FERREIRA et al., 2020). No entanto alguns estudos investigaram os efeitos na promoção de crescimento e fixação biológica de nitrogênio em plantas de interesse comercial e econômico, como a soja e feijão, combinando dois rizóbios distintos (LONGATTI et al., 2013; JESUS et al., 2018; VARGAS-DÍAZ et al., 2019; CARVALHO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021; LEITE et al., 2022).

Plantas de feijão-comum coinoculadas produziram mais nódulos, e acúmulo de biomassa seca da parte aérea e nitrogênio do que plantas inoculadas apenas com *Rhizobium tropici* em condições estéreis (JESUS et al., 2018). Estirpes de *Bradyrhizobium* sp. nativos de nódulos de *Glycine max* cultivada em condições de campo combinada com a estirpe referencial *B. japonicum* USDA110 mostrou alto potencial para ser inoculado sozinho ou combinado, quando comparado com o controle sem inoculação (VARGAS-DÍAZ et al., 2019).

Estirpes de *Bradyrhizobium* podem beneficiar o crescimento do feijoeiro quando coinoculado com *Rhizobium tropici*, e seus efeitos positivos podem ser observados em estágios iniciais de crescimento (CARVALHO et al., 2020). A coinoculação *Rhizobium* com *Bradyrhizobium* teve um efeito positivo sobre o crescimento e a produtividade do feijoeiro em condições axênicas e em condições não estéreis (LEITE et al., 2021). As plantas coinoculadas produziram maior número e massa de nódulos que aquela inoculada somente com a estirpe referência recomendada *B. diazoefficiens* CIAT 899.

A coinoculação de *Bradyrhizobium* spp., isolados de solos do semiárido brasileiro, e a estirpe referência *B. pachyrhizi* BR 3262 evidenciou que tais bactérias interagiram entre si, melhorando o crescimento do feijão-caupi tanto em condições de solo estéril quanto não estéril (NASCIMENTO et al., 2021).

De acordo com a instrução normativa nº 13 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2011), as estirpes BR 8801 e BR 8802, pertencentes ao gênero *Rhizobium* são autorizadas para a produção de inoculantes, no Brasil, para *Gliricidia sepium*. Estudos relatam que a gliricídia estabelece simbiose preferencialmente com rizóbios de crescimento rápido, principalmente com espécies do gênero *Rhizobium*, entretanto o potencial de fixação biológica de nitrogênio pode variar conforme as diferentes

condições edafoclimáticas da região onde a planta é cultivada (ACOSTA-DURÁN; MARTÍNEZ-ROMERO, 2002; FLORENTINO et al., 2014; COELHO et al., 2018).

Até o momento não há informações sobre os efeitos da interação simbiótica entre *Sinorhizobium* e *Rhizobium* em *G. sepium*. Além disso, as estirpes de *Sinorhizobium* utilizadas para coinoculação neste estudo foram isoladas de solos do semiárido brasileiro associadas à gliricídia. Recentemente, foi o primeiro estudo no Semiárido brasileiro que verificou rizóbios desse gênero nodulando *G. sepium* (SANTOS, 2022).

Diante do exposto, tornam-se necessários estudos a fim de explorar a potencialidade biológica de fixação de nitrogênio de *Sinorhizobium* adaptados às condições climáticas locais. É importante a avaliação dessas estirpes coinoculadas com estirpes já autorizadas para gliricídia, com o intuito de investigar os efeitos desta interação e de explorar uma nova abordagem no incremento de insumos biotecnológicos para a espécie.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade de estirpes de *Sinorhizobium* spp. e eficiência simbiótica da coinoculação de estirpes de *Sinorhizobium* com duas estirpes referências de *Rhizobium* (BR 8801 e BR 8802) em *Gliricidia sepium*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as estirpes de *Sinorhizobium* por meio da análise de sequências multilocus (MLSA) os genes *nodC*, *nifH* e *gyrB*.
- Avaliar o desempenho da coinoculação das estirpes de *Sinorhizobium* com duas estirpes referências BR 8801 e BR 8802 no crescimento, acúmulo de nitrogênio e nodulação de gliricídia em solo estéril, em casa de vegetação.
- Avaliar o desempenho da coinoculação das estirpes de *Sinorhizobium* com duas estirpes referências BR 8801 e BR 8802 no crescimento, acúmulo de nitrogênio e nodulação de gliricídia em solo não estéril, em viveiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos da espécie *Gliricídia* (*Gliricidia sepium*)

Pertencente à família *Fabaceae* e nativa do México e América Central, a *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. é uma leguminosa arbórea, caducifólia, que apresenta ciclo perene e raízes profundas, a espécie pode chegar a atingir de 10 a 15 metros de altura (GÓMEZ et al., 2002). Apresenta crescimento rápido, propagando-se por semente ou estacas, e possui uma boa capacidade de rebrota (PEREIRA JÚNIOR et al., 2008).

A gliricídia é uma espécie tolerante a prolongados períodos de seca e tem adaptabilidade a uma grande variedade de solos, incluindo ácidos e erodidos, contudo apresenta um melhor desenvolvimento em solos de melhor fertilidade e profundos, e vegeta pouco em solos compactados e úmidos (BEMAL, 1988). Por ser uma espécie de fácil adaptação, foi introduzida em grande parte das zonas tropicais e naturalizada desde o norte da América do Sul até o Brasil, no Caribe, Havaí, oeste da África, além de países asiáticos como Índia, Sri Lanka, Indonésia, Tailândia, Filipinas, e também na Austrália (CATIE, 1991).

Dentre as espécies de interesse comercial e econômico, a *G. sepium*, depois de *Leucaena leucocephala*, é considerada a segunda leguminosa multifuncional mais importante (BATISH et al., 2007). Com ampla utilidade, que englobam: quebra vento, produção de madeira, adubo verde, sombreamento, cobertura morta e proteção do solo; a gliricídia promove ainda processos de recuperação e melhoria das condições físico-químicas e biológicas do solo (BARRETO E FERNANDEZ, 2001; ESPINDOLA et al., 2005; MARIN et al., 2006; REBRAAF, 2007; PAULA et al., 2015). Além disso, é amplamente utilizada em consórcio com gramíneas e outras forrageiras, na formação de cerca viva forrageira e bancos de proteína, como fonte de alimentação de animais, principalmente de ruminantes em pastejo (CARVALHO FILHO et al., 1997).

De acordo com alguns estudos a gliricídia pode fixar entre 45 a 300 kg ha<sup>-1</sup> de N por ano (DAKOTA E KEYA, 1997; SANGINGA, 2003; PAULINO et al., 2009; APOLINÁRIO et al., 2015). Este fato ocorre em razão da fixação do nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas conhecidas como rizóbios, que crescem em simbiose com as leguminosas (WILKINS et al., 2002). Esse processo é responsável pela quantidade deste nutriente que fica diretamente disponível para a planta, o que lhe confere um alto teor de proteína presente na biomassa (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A gliricídia estabelece simbiose preferencialmente com rizóbios de crescimento rápido, principalmente com espécies do gênero *Rhizobium*, entretanto o potencial de fixação

biológica de nitrogênio pode variar conforme as diferentes condições edafoclimáticas da região onde a planta é cultivada (ACOSTA-DURÁN E MARTÍNEZ-ROMERO, 2002; FLORENTINO et al., 2014; COELHO et al., 2018).

De acordo com a instrução normativa nº 13 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2011), as estirpes BR 8801 e BR 8802, pertencentes ao gênero *Rhizobium* são autorizadas para a produção de inoculantes, no Brasil, para *Gliricidia sepium*. Entretanto, deve-se considerar que o Brasil possui grande extensão territorial, apresentando, portanto, grande variabilidade nas condições de clima e solo, que, podem influenciar diretamente na eficiência da estirpe inoculante (CORDOVILLA et al., 1999).

São escassos os estudos relacionados com a diversidade de rizóbios capazes de estabelecer simbiose com *G. sepium* (Acosta-Durán e Martinez-Romero, 2002; Bala et al., 2003; Thiao et al., 2004) e ainda, estudos que comprovem a autenticação e eficiência simbiótica de rizóbios em promover a fixação de nitrogênio na espécie. Estudos relacionados com rizóbios capazes de estabelecerem simbiose com *G. sepium* e adaptados a diferentes condições edafoclimáticas constitui uma importante ferramenta de seleção de estirpes mais eficientes no fornecimento de nitrogênio, uma vez que esta leguminosa apresenta ampla distribuição ecológica (FLORENTINO et al., 2014).

## **2.2 Fixação biológica de nitrogênio**

Os microrganismos do solo desempenham um papel importante na manutenção da fertilidade do solo em relação à nutrição da planta e qualidade do solo. Com exceção da água, o nitrogênio é considerado o fator mais limitante para o crescimento das plantas no seu ambiente natural (FRANCO E DÖBEREINER, 1994).

O nitrogênio (N) é um macronutriente indispensável para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este nutriente está presente na forma gasosa ( $N_2$ ), correspondendo a cerca de 78% da composição da atmosfera. Embora esteja presente em grande quantidade, não é aproveitável pelas plantas, sendo necessária a ação de microrganismos diazotróficos, que são capazes de reduzir o nitrogênio molecular ( $N_2$ ) em uma forma assimilável, a amônia ( $NH_3$ ), e torná-la disponível para as plantas (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Todo o processo é conhecido como FBN (fixação biológica de nitrogênio).

Dentre os processos biológicos que ocorrem na natureza, a fixação biológica de nitrogênio é considerada um dos mais importantes, superado apenas pela fotossíntese (ZAGO et al., 2018). Esta importância deve-se principalmente ao fato da contribuição da FBN ser o processo que apresenta maior subsídio para a entrada deste elemento nos ecossistemas terrestres, o que é considerado importante do ponto de vista agrícola (FERNANDES JÚNIOR, 2009).

A FBN é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura, e a inoculação (produtos contendo células bacterianas) de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países (CHAGAS JÚNIOR, 2007). Esse processo é responsável pela fixação de aproximadamente  $21 \times 10^9$  Kg de nitrogênio anualmente (HERRIDGE et al., 2008), e pode suprir total ou parcialmente a demanda desse elemento requerido pela planta por um custo menor, em comparação aos fertilizantes nitrogenados químicos (CHUEIRE et al., 2003).

Os microorganismos diazotróficos apresentam diferentes estilos de vida, desde vida livre até associações simbióticas bem específicas. A associação simbiótica entre bactérias diazotróficas, conhecidas como rizóbios e leguminosas é o mais bem estudado (FREITAS et al., 2015).

Na associação com leguminosas, os rizóbios, instalam-se nos pêlos radiculares, multiplicam-se e formam estruturas especializadas, denominadas nódulos. No interior dessas estruturas esses microorganismos se diferenciam em bacteroides (rizóbios com alterações metabólicas e morfológicas) e por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase, são capazes de converter o  $N_2$  atmosférico em amônia (LOPES, 2007), que é usado pela planta como fonte de nitrogênio. Na nodulação os genes *nod* são responsáveis pela comunicação química entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira e são encontrados apenas em bactérias formadoras de nódulos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A partir da associação estabelecida o nitrogênio é convertido em compostos nitrogenados usados em diversos processos químicos e biológicos do solo, importantes para a nutrição das plantas. O aumento do conteúdo de nitrogênio no sistema solo-planta por meio do mecanismo da FBN é graças à simbiose entre essas plantas e a espécie de rizóbio (ARORA et al., 2018).

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio tem se mostrado uma alternativa promissora para a substituição do uso de fertilizantes químicos em diversas culturas. A busca por rizóbios com elevado potencial simbiótico tem revelado estirpes capazes de incrementar a

produtividade das culturas e diminuir os custos de produção agrícola (COSTA et al., 2014; RUFINI et al., 2014; MARINHO et al., 2017).

A FBN atua como um importante suporte para elevadas produções no campo, aliada a racionalização dos custos e tendo uma estrita ligação com o equilíbrio do meio ambiente (QUESADA et al., 2003). A racionalização dos custos diminui os gastos com fertilizantes nitrogenados químicos, e o equilíbrio ambiental é alcançado por meio da eliminação do impacto negativo destes produtos sobre o ambiente (STRALIOTTO et al., 2002).

### 2.3 O gênero *Sinorhizobium*/grupo *Ensifer*

O gênero *Sinorhizobium* pertence à família *Rhizobiaceae* subdivisão das  $\alpha$ -proteobacteria, em conjunto com importantes bactérias patogênicas humanas como a *Bartonella* e a *Brucella*, e com várias outras bactérias associadas a plantas de importância agrícola, como *Agrobacterium*, *Ochrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (TEYSSIER et al., 2004).

Os primeiros representantes do gênero foram efetivamente descritos por Chen et al., (1988), o qual se baseou principalmente em estudo taxonômico numérico, determinações da proporção de bases do DNA e dados de hibridização DNA-DNA. A partir dessas análises, foi evidenciado que os rizóbios de crescimento rápido isolados de raízes de soja e do solo, representavam membros de um novo gênero, e não uma espécie do gênero *Rizhobium*. Foi proposto o nome *Sinorhizobium* como um nome genérico apropriado, que significa rizóbio isolado na China.

As espécies pertencentes ao gênero *Sinorhizobium* são bactérias gram-negativas, aeróbicas e móveis. As colônias são circulares, convexas, semitransparente, elevado e mucilaginoso, geralmente com 2 a 4 mm de diâmetro, apresenta crescimento rápido entre 3 a 5 dias e produzem uma reação ácida em meio de cultivo YMA. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 30 °C, entretanto algumas estirpes crescem a 35 °C e outras a 10 °C, o pH varia entre 6 e 8, porém existem estirpes que crescem em pH 5 e outras em 10,5 (CHEN et al., 1988).

Atualmente, de acordo com o banco de dados do NCBI, existem 21 espécies descritas incluídas no gênero *Sinorhizobium*: *S. meliloti* (Dangeard 1926; Lajudie et al., 1994), *S. fredii* (Scholla e Elkan 1984), *S. xinjiangense* (Chen et al., 1988), *S. saheli* (Lajudie et al., 1994), *S. teranga* (Lajudie et al., 1994), *S. medicae* (Rome et al., 1996), *S. kostiense* (Nick et al., 1999), *S. arboris* (Nick et al., 1999), *S. kummerowiae* (Wei et al., 2002), *S. morelense* (Wang

et al., 2002), *S. adhaerens* (Casida, 1982; Willems et al., 2003), *S. americanum* (Toledo et al., 2004), *S. chiapanecum* (Rincón-Rosales et al., 2009), *S. numidicum* (Merabet et al., 2010), *S. garamanticum* (Merabet et al., 2010), *S. mexicanum* (Lloret et al., 2011), *S. sojae* (Li et al., 2011), *S. psoraleae* (Wang et al., 2015), *S. alkalisoli* (Li et al., 2016), *S. glycinis* (Yan et al., 2016), *S. shofinae* (Chen et al., 2017).

Algumas das espécies do grupo *Sinorhizobium/Ensifer* foram isoladas, sobretudo na China, país onde foi descrita a primeira espécie do gênero. Contudo, as espécies vegetais de onde foram isoladas as bactérias pertencentes ao gênero descritas até o momento é bastante diversificado.

*S. meliloti* isolada de *Medicago sativa* e *Melilotus* spp. em Xinjiang, China; as espécies *S. sahelii* e *S. terangae* foram isoladas de diferentes espécies de *Sesbania* e *Acacia* em vários locais do Senegal na África Ocidental; *S. fredii* e *S. xinjiangense* isolados de nódulos de *Glycine max* na província de Honan, na China; *S. medicae* isolado de *Medicago polymorpha* no sul da França e bacia do Mediterrâneo; *S. kostiense* e *S. arboris* isolados de nódulos de *Acacia Senegal* e *Prosopis chilensis* no Sudão e Quênia; *S. kummerowiae* isolado de *Kummerowia stipulacea* no Planalto de Loess, na China; *S. morelense* isolado de nódulos de *Leucaena leucocephala* em Morelos, México.

*S. adhaerens* isolado do solo, nos Estados Unidos; *S. americanum* isolado de *Acacia* spp. no México; *S. chiapanecum* isolado de *Acaciella angustissima* no México; as espécies *S. numidicum* e *S. garamanticum* isoladas de nódulos de *Lotus arabicus*, *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* e *Medicago sativa* no norte da África; *S. mexicanum* isolado de *Acacia angustissima*, no México; *S. sojae* isolado de nódulos de *Glycine max*, na China; *S. psoraleae* isolado de nódulos de *Psoralea corylifolia*, na China; *S. alkalisoli* isolado de nódulos de *Sesbania cannabina*, na China; *S. glycinis* isolado de nódulos de *Astragalus mongholicus* e *Glycine max*, na China; *S. shofinae* isolado de nódulos de *Glycine max*, na China.

As espécies descritas do gênero *Ensifer*: *E. alkalisoli*, *E. americanum*, *E. arboris*, *E. fredii*, *E. garamanticum*, *S. glycinis*, *E. kostiense*, *E. kummerowiae*, *E. medicae*, *E. meliloti*, *E. mexicanum*, *E. numidicum*, *E. psoraleae*, *E. sahelii*, *E. shofinae*, *E. sojae*, e *E. terangae* foram transferidas para o gênero *Sinorhizobium*.

O gênero *Ensifer* é considerado sinônimo de *Sinorhizobium* pela Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática de Procariontes (Opinião Judicial 84). Entretanto, o subcomitê sobre a Taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium* se opôs a esta decisão na sua reunião em Gent, Bélgica em 2008 (Lindstrom e Young, 2009). Recentemente, Kuzmanović

et al., (2022) forneceram evidências para a separação dos dois gêneros como distintamente diferentes. Dada à natureza controversa da questão, o banco de dados de taxonomia do NCBI mantém ambos os nomes de gênero para uso pelos requerentes na nomeação de novas espécies.

#### **2.4 Análise de Sequências Multilocus (MLSA)**

Métodos genotípicos exercem um papel fundamental na identificação e classificação filogenética em vários níveis taxonômicos, assim como nas análises de diversidade de táxons procarióticos (GLAESER E KAMPTER, 2015).

A filogenia bacteriana é tradicionalmente baseada na análise do gene ribossomal 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991). Entretanto, genes ribossomais apresentam resolução limitada no nível de espécie (KONSTANTINIDIS et al., 2007). Dessa forma, o uso exclusivo do gene 16S rRNA em estudo taxonômico, filogenético e evolutivo de espécies muito relacionadas nem sempre possibilita a identificação das divergências evolutivas no nível da espécie (STACKEBRANDT et al., 2002).

Um método aplicado na taxonomia procariótica considerando fragmentos internos de vários genes codificadores de proteínas é denominado análise de sequência multilocus (MLSA), que foi um termo introduzido por Gevers et al. (2005). O MLSA é baseado na tipagem de sequência multilocus (MLST), que foi introduzida pela primeira vez por Maiden et al. (1998) como método de tipagem microbiana para estudos epidemiológicos e genéticos populacionais de bactérias patogênicas (espécies).

O sequenciamento de genes constitutivos (*housekeeping*) tem sido cada vez mais comum. Esses genes codificam proteínas com funções vitais para as células. Além disso, são genes de cópias únicas no genoma, teoricamente menos prováveis de sofrer transferência horizontal e, por codificarem uma proteína, tornam a porcentagem de substituição nucleotídica superior àquela encontrada no gene 16S rRNA (SAWADA et al., 1999; MARTENS et al., 2008).

Como resultado, a integração do MLSA na taxonomia procariótica deve levar a um procedimento de identificação em duas etapas. Primeiro, a análise da sequência do gene 16S rRNA deve ser aplicada para atribuir uma nova cepa ao nível da família ou mesmo do gênero. Em segundo lugar, com base na atribuição inicial, o isolado deve ser atribuído de forma mais exata dentro de um gênero usando a abordagem MLSA. Devem ser usados genes que sejam

cópias únicas e onipresentes, pelo menos no táxon estudado, e genes que possam ser conferidos por vantagens seletivas (MAIDEN, 2006).

De início a metodologia de MLSA baseava-se na análise das sequências concatenadas de no mínimo cinco genes conservados, concatenados em uma única sequência (STARCKEBRANDT et al., 2002). No entanto, Konstantinidis et al. (2006) observou que o número mínimo de três genes seria o suficiente para se ter uma resolução filogenética, sendo que, se um dos genes apresentasse transferência horizontal ou evento de recombinação, os outros dois compensariam esse primeiro gene.

Exemplos de genes *housekeeping* que são frequentemente usados como marcadores filogenéticos alternativos em rizóbios incluem *recA* e *atpD* (Gaunt et al., 2001), *glnA* (Turner e Young, 2000) e *gyrB* (MARTENS et al., 2008). Os rizóbios também são determinados usando vários genes que lhes conferem especificidade na nodulação e fixação de nitrogênio. Estes incluem os genes *nod* e *nifH*, que codificam respectivamente para a produção de fatores Nod e enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio (PERRET et al., 2000).

Dados confirmam que o potencial de discriminação em nível de espécies em estirpes bacterianas é maior usando MLSA de genes *housekeeping* do que genes 16S rRNA. Em testes de diferença de comprimento de incongruência, o gene 16S rRNA foi considerado significativamente incongruente com os outros genes, indicando que este gene não deve ser usado como um único indicador de parentesco neste grupo (MARTENS et al., 2007).

Em comparação com o gene 16S rRNA, o maior grau de divergência de sequência de genes *housekeeping* são superiores para fins de identificação, uma vez que as sequências genéticas do gene 16S rRNA é mais conservadas e nem sempre permite a discriminação de espécies (MARTENS et al., 2008). Em contraste com a hibridização DNA-DNA e análise da sequência do gene 16S rRNA, a MLSA é capaz de produzir clusters de sequência em uma ampla gama de níveis taxonômicos, desde intraespecífico através do nível de espécie até clusters em níveis mais elevados (GEVERS et al., 2005).

## 2.5 Coinoculação

A inoculação é uma técnica que consiste na seleção prévia de microrganismos capazes de promover benefícios ao crescimento vegetal, e que são adicionados às sementes de plantas antes de sua semeadura (EMBRAPA, 2020). Essa técnica em leguminosas tem o objetivo de promover a fixação simbiótica de nitrogênio e aumentar a produção em campo, sendo uma prática agrícola comumente utilizada (THIES et al., 1991).

Considerando os efeitos promovidos pela inoculação e as perspectivas que sua aplicação agrega em termos de crescimento das plantas, pesquisadores desenvolveram uma técnica com o objetivo de combinar mais de um tipo de bactéria, de forma a avaliar a resposta das plantas em termos de desenvolvimento vegetativo, resistência a condições de estresse e produção (BASTOS, 2016) esta técnica é conhecida como coinoculação ou inoculação mista.

A técnica é baseada na mistura de inoculantes com estirpes de microrganismos distintos, os quais produzem um efeito sinérgico, com o objetivo de obter resultados produtivos superiores, em comparação quando os mesmos são utilizados na forma isolada (BÁRBARO et al., 2008). A mistura de microrganismos pode também produzir um efeito antagônico que pode ser resultante de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) ou competição por espaço e nutrientes.

A resposta positiva à coinoculação pode ser atribuída a uma nodulação mais precoce, ao aumento do número de nódulos e ao melhor desenvolvimento do sistema radicular (REMANS et al., 2008), que podem levar a uma maior taxa de fixação e disponibilidade de nitrogênio e a maior absorção de nutrientes, que, conseqüentemente, pode culminar com a maior produção de grãos (LEITE, 2021).

Em muitos trabalhos que envolvem a técnica de coinoculação utiliza-se a BPCP referência *Azospirillum brasilense*, por apresentar diversas comprovações sobre a sua eficiência, principalmente no cultivo de cereais, e também os efeitos benéficos quando associados aos rizóbios (FERLINI, 2006). A bactéria *Azospirillum* em conjunto com *Bradyrhizobium*, ocasiona ganhos de até 16,1% na produtividade da soja e causa uma nodulação mais abundante e precoce, além do aumento de nitrogênio acumulado na parte aérea da planta (CHIBEBA et al., 2015; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

A utilização do *Azospirillum brasilense* em associação com rizóbio em leguminosas tem um efeito benéfico, que se deve à aptidão de produção de fitormônios, resultando em aumento do sistema radicular e a possibilidade de explorar um volume mais extenso de solo (BÁRBARO et al., 2008). Bashan e Bashan (2005) afirmam que a inoculação mista de *Azospirillum* e *Rhizobium* estimula a formação de nódulos, resultando em aumento no número e na massa, estimula a diferenciação das células epidérmicas nos pelos radiculares, produtividade de grãos e área da superfície radicular, em leguminosas.

Considerando os efeitos sinérgicos que a coinoculação entre rizóbios e bactérias não-rizobianas tem sobre o crescimento de plantas e nodulação de leguminosas de interesse econômico como a soja e o feijão, alguns estudos têm investigado os efeitos na promoção de crescimento e fixação biológica combinando duas bactérias rizobianas distintas (JESUS et al.,

2018; VARGAS-DÍAZ et al., 2019; CARVALHO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021; LEITE et al., 2022).

Plantas de feijão comum coinoculadas produziram mais nódulos, e acúmulo de biomassa seca da parte aérea e nitrogênio do que plantas inoculadas apenas com *Rhizobium tropici* em condições estéreis, além disso, foram observadas respostas significativas na maior dose de inóculo e uma correlação significativa entre a dose e o peso seco da parte aérea (JESUS et al., 2018).

Estirpes de *Bradyrhizobium* sp. nativos de nódulos de *Glycine max* cultivada em condições de campo combinada com a estirpe referencial *B. japonicum* USDA110, mostrou alto potencial para ser inoculado sozinho ou combinado, pois pH, nodulação, peso seco, teor relativo de clorofila e atividade de nitrogenase foram significativamente melhores quando comparado com o controle negativo (VARGAS-DÍAZ et al., 2019).

Estirpes de *Bradyrhizobium* beneficiaram o crescimento do feijoeiro quando coinoculado com *Rhizobium tropici*, e seus efeitos positivos podem ser observados em estágios iniciais de crescimento. O efeito desta coinoculação é comparável ao da coinoculação tradicional de *Rhizobium* com *Azospirillum brasilense*, sendo seus resultados consistentes em duas cultivares de feijão comum, cultivar Pérola e BRS Esteio, ambas com inserção em sistemas produtivos brasileiros e com potencial para BNF (CARVALHO et al., 2020).

A coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. isolados de solos do semiárido brasileiro, e a estirpe referência *B. Pachyrhizi* BR 3262 evidenciaram que tais bactérias interagiram entre si, melhorando o crescimento do feijão-caupi tanto em condições de solo estéril e não estéril, melhor do que a inoculação de uma única estirpe (NASCIMENTO et al., 2021).

A coinoculação *Rhizobium* com *Bradyrhizobium* teve um efeito positivo sobre o crescimento e a produtividade do feijoeiro em condições axênicas e em condições não estéreis. Este estudo também verificou que a nodulação foi beneficiada de modo que as plantas coinoculadas produziram maior número e maior massa de nódulos que aquela somente inoculada com a estirpe referência recomendada *B. diazoefficiens* CIAT 899 (LEITE et al., 2022).

Embora evidenciado os resultados positivos que os rizóbios promovem no crescimento e desenvolvimento de culturas de importância econômica, ainda faltam abordagens sobre a coinoculação com espécies de rizóbios do mesmo gênero ou distintos, em outras plantas de interesse comercial e com características de múltiplos usos, como é o caso da gliricídia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem dos isolados bacterianos

As estirpes utilizadas nos experimentos foram obtidas da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido, localizado na cidade de Petrolina – PE. Foram selecionadas 11 estirpes pertencentes ao gênero *Sinorhizobium* que tiveram o gene 16S rRNA sequenciados, em estudos realizado por Santos (2022). As estirpes controle utilizadas como referências foram as BR 8801 e BR 8802 pertencentes ao gênero *Rhizobium* (BRASIL, 2011), ambas as estirpes são autorizadas para a produção de inoculantes para *G. sepium*, no Brasil.

As estirpes armazenadas em meio de cultura YM com glicerol 25% (v/v) preservados em ultrafreezer a -80 °C foram repicadas em placa em meio de cultura YMA para renovação das colônias e mantidas sob refrigeração para, quando necessário, serem utilizadas.

#### 3.2 Extração de DNA

As bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YM e mantidos em um agitador orbital sob agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente, de acordo com o tempo de crescimento dos isolados. A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada por meio de kit comercial para extração de DNA genômico (LGC Biotecnologia), de acordo com instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20 °C para posteriores reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

#### 3.3 Amplificação e sequenciamento parcial dos genes simbióticos (*nodC* e *nifH*) e gene constitutivo *gyrB*

A avaliação das relações filogenéticas dos isolados rizobianos foi realizada por meio do sequenciamento dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* e gene constitutivo *gyrB*. O gene 16S rRNA foi o primeiro a ser sequenciado (Santos, 2023), a fim de realizar o agrupamento e seleção dos isolados rizobianos para serem submetidos ao sequenciamento dos demais genes.

Os pares de primers utilizados para o gene *nodC* foram: *nodC*for540 (TGATYGAYATGGARTAYTGGCT) e *nodC*rev1160 (CGYGACARCCARTCGCTRITG) (SARITA et al., 2005) e o par de primers universal para o gene *nifH* foram PolF

(TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (POLY et al., 2001). O mix foi preparado separadamente para ambos os genes utilizando buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 1,2 mM, primers do gene *nodC* 0,75, µM, primers do gene *nifH*, 1,00 µM, taq DNA polimerase 0,25 U, DNA 3 µL e o volume completado para 30 µL com água ultrapura autoclavada. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems) com as seguintes condições de PCR para o gene *nodC*: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min e 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 55 °C por 1 min, extensão 72 °C por 1 min e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min. Para o gene *nifH* as condições de PCR foram: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min e 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 55 °C por 45 segundos, extensão 72 °C por 1 min e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min.

Para o gene *gyrB* utilizou-se, os iniciadores: *gyrB343F* (TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG) e *gyrB1043R* (AGCTTGTCCTTSGTCT GCG) (MARTENS et al., 2008) para amplificar o fragmento de aproximadamente 580 pb. O volume final das reações foi 30 µL, contendo: tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, dNTP 0,4 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U, iniciadores (0,2 µM) e 3 µL de DNA. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95 °C por 2 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (58 °C por 30 segundos), extensão (72 °C por 1 min), e extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR foram corados com Sybr Safe na proporção de 3:2 e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (p/v) a 120 V por 40 minutos em tampão Tris-ácido bórico - EDTA (TBE) 0,5x. O gel foi visualizado em transluminador (Loccus Biotecnologia), acoplado ao fotodocumentador (Modelo UVDoc 400i - Delpho Instruments), e fotografado com câmera digital (Canon EOS Rebel T5i). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se o marcador de peso molecular 100 bp ladder/M1062 (Sinapse Inc). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial de purificação de PCR EasyPure Purification Kit Transgen Biotech, liofilizados e enviados para serem sequenciados na empresa CLINILAB Laboratório Ltda (Salvador – BA).

Após a obtenção das sequências, a avaliação da qualidade foi realizada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a similaridade com as sequências das estirpes tipo (*type strain*) utilizando-se a ferramenta “basic local alignment tool”, algoritmo Blastn (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências das estirpes tipo com maior similaridade

com os isolados rizobianos, foram baixadas para o alinhamento e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. O método Maximum-likelihood e o modelo Jukes-Cantor foram utilizadas para a construção das árvores filogenéticas com auxílio do programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2013).

### **3.4 Avaliação do efeito da coinoculação de *Sinorhizobium* com as estirpes referências BR 8801 e 8802 em *Gliricidia sepium***

#### **3.4.1 Preparo dos inóculos**

Todos os isolados que foram utilizados nos experimentos foram cultivados em Erlenmeyers contendo meio YM sem adição do indicador de pH azul de bromotimol, e incubados sob agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente em mesa agitadora orbital, de acordo com o tempo de crescimento das estirpes. Antes da montagem dos experimentos, os inóculos das estirpes contendo *Sinorhizobium* foram transferidos para tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL e as estirpes referências para tubos de 250 mL (todos devidamente esterilizados) e centrifugados por 10 minutos a 6000 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet formado pelas células bacterianas foram ressuspensas com solução salina a uma concentração de 0,85%. A densidade ótica (DO) foi ajustada para uma concentração de 0,2 no comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA).

#### **3.4.2 Experimento I: vasos com solo estéril**

Este experimento teve como objetivo avaliar os efeitos sinérgicos ou antagônicos da coinoculação das estirpes de *Sinorhizobium* com as estirpes referências BR 8801 e 8802, em substrato estéril em casa de vegetação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 38 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram em: inoculação das 11 estirpes de *Sinorhizobium*, BR 8801 e 8802 (13 tratamentos); coinoculação das 11 estirpes com a BR 8801 (11 tratamentos); coinoculação das 11 estirpes com a BR 8802 (11 tratamentos); coinoculação das estirpes BR 8801 e BR 8802 (1 tratamento); um tratamento controle com fornecimento de nitrogênio (com base em uma adubação de 80 kg por ha<sup>-1</sup> de N), fornecido como NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> com aplicação de 50 mg de N semanalmente e um tratamento absoluto, sem inoculação e aplicação de nitrogênio.

Para o plantio foram utilizados vasos de poliestireno com capacidade de 500 mL. Os vasos foram desinfestados com álcool 70% v/v<sup>-1</sup> e hipoclorito de sódio a 1% v/v<sup>-1</sup> e lavados com água destilada e estéril. Os vasos foram preenchidos com solo esterilizado por autoclavagem (pressão de 1,5 atm e temperatura de 120 °C) duas vezes, por duas horas, com intervalo de 48 h entre as esterilizações.

As sementes de gliricídia antes da semeadura foram desinfestadas superficialmente por submersão em álcool 96% por 30s e hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos, seguidos por 10 lavagens com água destilada e estéril. Foram semeadas quatro sementes por vaso. Em cada tratamento de inoculação única foi aplicado 1 mL do inóculo diretamente sobre cada semente, para os tratamentos coinoculados cada semente recebeu 1 mL de inóculo da respectiva cepa de *Sinorhizobium*, mais 1 mL de inóculo da estirpe referencia. Em seguida, para evitar possíveis contaminações, as sementes inoculadas foram cobertas com solo estéril.

Aos 15 dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbastes das plantas sobressalentes, deixando apenas uma planta por vaso. A nutrição complementar foi realizada com a aplicação de solução nutritiva estéril e livre de nitrogênio (NORRIS E T'MANNETJE, 1964) uma vez por semana, iniciando após a queda dos cotilédones até a última semana de condução do experimento. A irrigação com água destilada e estéril (ADE) foi realizada sempre que necessário.

As plantas foram colhidas aos 90 DAE, após a coleta, as raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente e a parte aérea separada, em seguida os nódulos foram destacados das raízes, secos em sílica gel, pesados e contados. Ambas as partes das plantas (parte aérea e raízes) foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar forçado a 65 °C até peso constante durante quatro dias, e pesados em balança analítica.

Para este ensaio, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca do nódulo (MSN), conteúdo de nitrogênio da parte aérea (CNPA) e nitrogênio total (N total) foram avaliados. A determinação do teor de N na parte aérea foi realizada de acordo com Liao (1981) pelo método semi-micro Kjeldahl. O N total (mg planta<sup>-1</sup>) foi calculado pela multiplicação do teor de N (mg g<sup>-1</sup>) pela massa da parte aérea seca (g planta<sup>-1</sup>) de cada parcela. A relação entre N total e MSN foi usada para estimar a eficiência de nodulação (EN).

### **3.4.3 Experimento II: vasos com solo não estéril**

O experimento foi conduzido em condições de viveiro, nas dependências da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, no período de março a junho de 2023. Utilizou-se como substrato

uma amostra de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletada da camada arável no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido (09°08'13 "S; 40° 18° 24" W). Uma amostra composta do solo utilizado no experimento foi analisada quanto as suas características químicas, de acordo com Teixeira et al. (2017), que estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização química do solo utilizado no experimento de coinoculação no crescimento vegetal de *Gliricidia sepium*. Petrolina – PE, 2023.

C.E	pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	Cu	Fe	Mn	Zn
mS cm <sup>-1</sup>	-	mg dm <sup>-3</sup>	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----								%	----- mg dm <sup>-3</sup> -----			
0,43	6,5	14,46	0,19	0,05	1,6	2,80	0,00	1,0	4,6	5,6	82,9	0,62	72,79	28,11	3,34

C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial hidrogeniônico; P: fósforo; K: potássio; Na: sódio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: saturação de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação por bases.

O experimento foi implantado em vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL, constituído pelos mesmos 38 tratamentos utilizados no experimento em solo estéril, em delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições cada tratamento.

O preparo dos inoculantes foi feito conforme descrito no subitem 3.4.1. Antes do plantio as sementes foram desinfestadas superficialmente conforme metodologia descrita no item 3.3.1, e no momento do plantio foram semeadas quatro sementes por vaso, cada semente recebeu nos tratamentos de inoculação única 1 mL do inóculo, para os tratamentos coinoculados cada semente recebeu 1 mL de inóculo da respectiva estirpe de *Sinorhizobium*, mais 1 mL de inóculo da estirpe referência.

O desbaste foi realizado 15 dias após a emergência deixando apenas uma planta por vaso. A irrigação das plantas foi realizada sempre que necessário. O experimento foi coletado aos 90 dias, e as análises foram realizadas conforme descritas no experimento anterior.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados das variáveis foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (1968). A análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de variação de média de *Scott-Knott* ao nível de significância de 5%. Foi realizada uma análise utilizando o teste t pareado, comparando cada média dos tratamentos inoculados e coinoculados com o controle sem inoculação. Ao final foi feita uma Análise de Componentes

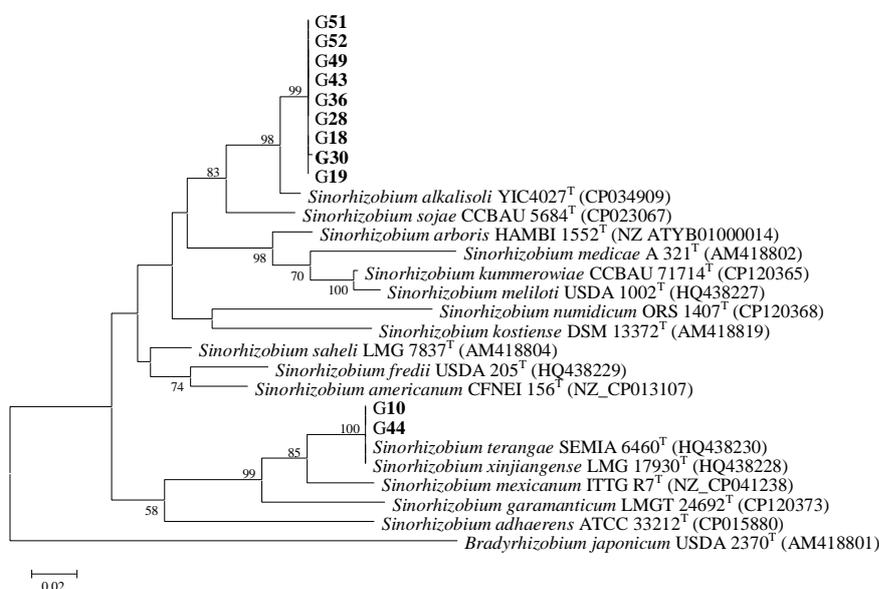
Principais (PCA). As análises dos componentes estudados foram realizadas utilizando o pacote estatístico R Studio software.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES *gyrB*, *nodC* e *nifH*

#### 4.1.1 Sequenciamento parcial do gene constitutivo *gyrB*

Após a análise da qualidade das sequências, todas apresentaram boa qualidade e tamanho adequado e foram utilizadas para comparação com aquelas depositadas no banco de dados GenBank. A partir da árvore filogenética construída das sequências obtidas, foi possível verificar a formação de dois principais grupos, como mostra a figura 1.



**Figura 1.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *gyrB* de onze estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares glicircídia (*Glicircidia sepium*) e 16 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (533 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 2370T foi incluída como outgroup. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

O primeiro grupo formado pelas bactérias G18, G19, G28, G30, G36, G43, G49, G51 e G52 e com um valor de bootstrap de 99%, está relacionado como mais próximos à estirpe tipo de *S. alkalisoli* YIC4027<sup>T</sup>. O segundo grupo, formado pelas bactérias G10 e G44 e com um valor de bootstrap de 100% agrupou-se com a estirpe tipo *S. terangae* LMG7834<sup>T</sup> e *S. xinjiangense* CCBAU110<sup>T</sup>.

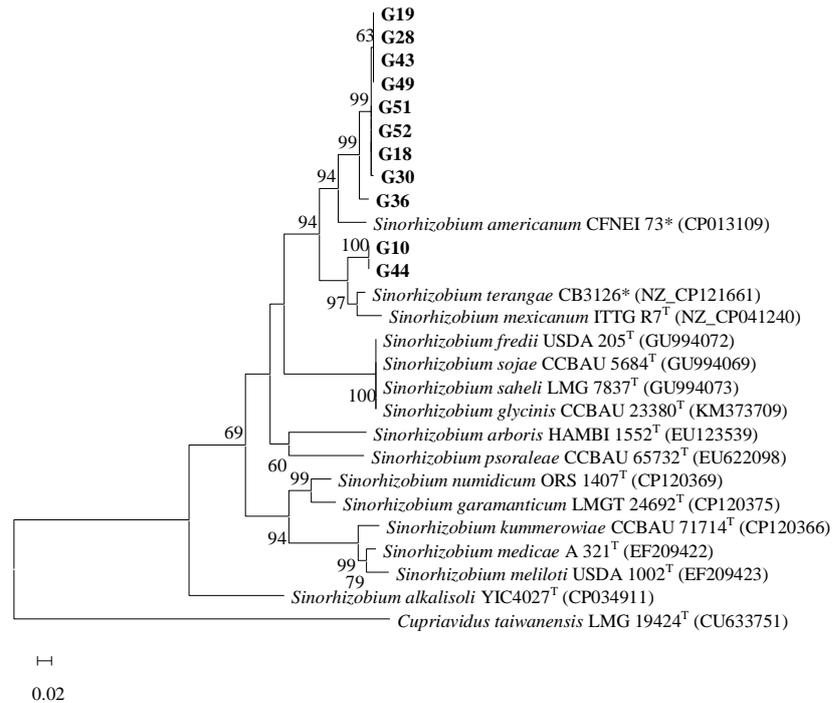
Os isolados identificados no primeiro grupo como sendo próximos da estirpe tipo *S. alkalisoli* YIC4027<sup>T</sup> apresentaram os seguintes valores de similaridades com a espécie: G18 (96,07%), G19 (96,03%), G28 (96,23%), G30 (96,95%), G36 (97,13), G43 (96,65%), G49 (96,58%), G51 (95,56%) e G52 (95,50%). A bactéria G10 apresentou similaridade de 100% com as estirpes tipo *S. teranga* LMG7834<sup>T</sup> e *S. xinjiangense* CCBAU110<sup>T</sup>, e a bactéria G44 com similaridade de 97,86% com *S. teranga* LMG7834<sup>T</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *gyrB* de 11 bactérias, identificadas no gênero *Sinorhizobium*, isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*).

Estirpes	Extensão (pb)	Sequências mais similares - GenBank		
		Espécie	Similaridade (%)	Nº de Acesso
G 10	550	<i>S. teranga</i> LMG7834 <sup>T</sup>	100.00	HQ438230
		<i>S. xinjiangense</i> CCBAU110 <sup>T</sup>		HQ438228
G 18	635	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.07	CP034909
G 19	652	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.03	CP034909
G 28	561	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.23	CP034909
G 30	558	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.95	CP034909
G 36	557	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	97.13	CP034909
G 43	596	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.65	CP034909
G 44	649	<i>S. teranga</i> LMG7834 <sup>T</sup>	97.86	HQ438230
G 49	641	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	96.58	CP034909
G 51	649	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	95.56	CP034909
G 52	639	<i>S. alkalisoli</i> YIC4027 <sup>T</sup>	95.50	CP034909

#### 4.1.2 Sequenciamento parcial do gene simbiótico *nodC*

Todos os isolados submetidos ao sequenciamento do gene simbiótico *nodC* apresentaram sequências de boa qualidade e foram utilizados para construção da árvore filogenética. A partir da árvore filogenética construída das sequências obtidas do gene *nodC*, foi possível verificar a formação de dois principais grupos, como mostra a figura 2.



**Figura 2.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *nodC* de nove estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares de glicírcia (*Gliricidia sepium*) e 13 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (366 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424<sup>T</sup> foi incluída como outgroup. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos. \*Não é estirpe tipo.

O primeiro grupo com um valor de bootstrap de 99% ficou próximo da estirpe *S. americanum* CFNEI 73 sendo formados dois subgrupos: o primeiro com as bactérias G19, G28, G43 e G49, o segundo pelas bactérias G18, G30, G51 e G52, e a G36 independente. O segundo grupo com um valor de bootstrap de 100% foi formado pelas bactérias G10 e G44 ficaram próximos das estirpes *S. terangae* CB3126 e *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup>.

Os isolados do primeiro grupo apresentaram baixa similaridade com a estirpe *S. americanum* CFNEI 73 e a estirpe tipo *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup>, os valores de similaridade foram, respectivamente: G18 (90,83-87,37%), G19 (90,07-86,60%), G28 (91,17-87,43%), G30 (89,40-86,12%), G36 (90,30-86,95%), G43 (90,03-86,36%), G49 (89,88-86,32%), G51 (92,36-88,30%) e G52 (92,00-88,00%). As duas bactérias do segundo grupo também apresentaram de similaridade baixa com a estirpe tipo *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup>, sendo G10 (92,67%) e G44 (92,16%) (Tabela 3).

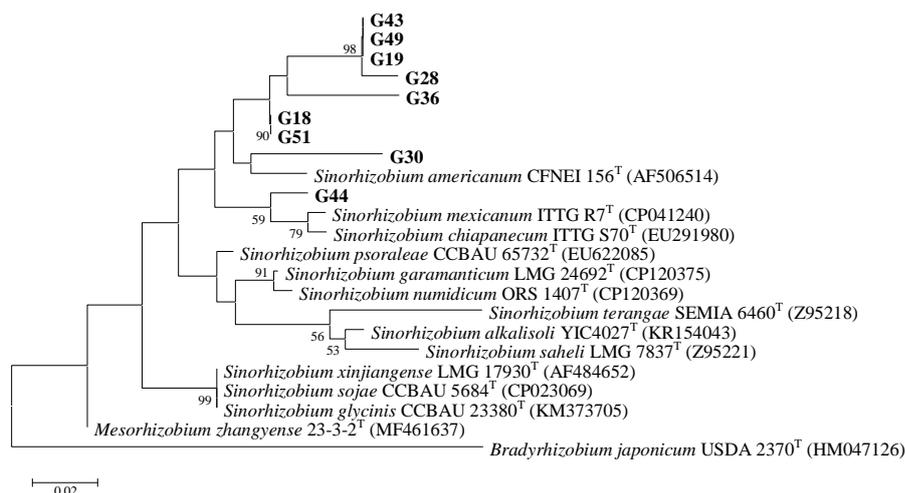
**Tabela 3.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *nodC* de 11 bactérias, identificadas no gênero *Sinorhizobium*, isoladas de nódulos radiculares de gliricídia (*Gliricidia sepium*).

Estirpes	Extensão (pb)	Sequências mais similares - GenBank		
		Espécie	Similaridade	Nº de Acesso
G10	559	<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	92.67	CP041240
G18	569	<i>S. americanum</i> CFNEI 73*	90.83	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	87.37	CP041240
G19	562	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	90.07	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	86.60	CP041240
G28	562	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	91.17	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	87.43	CP041240
G30	564	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	89.40	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	86.12	CP041240
G36	563	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	90.30	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	86.95	CP041240
G43	571	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	90.03	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	86.36	CP041240
G44	560	<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	92.16	CP041240
G49	558	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	89.88	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	86.32	CP041240
G51	471	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	92.36	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	88.30	CP041240
G52	475	<i>S. americanum</i> CFNEI 73	92.00	NZ_CP013109
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	88.00	CP041240

\*Não é estirpe tipo.

#### 4.1.3 Sequenciamento parcial do gene simbiótico *nifH*

Após a análise da qualidade das sequências, duas bactérias não apresentaram boa qualidade e tamanho adequado, então não foram inseridas na árvore filogenética. A análise filogenética das bactérias submetidas para o sequenciamento do gene simbiótico *nifH*, aponta a formação de dois grupos. O primeiro formado por dois subgrupos: o primeiro (G19, G43 e G49), o segundo (G18 e G51) e três estirpes de forma isolada (G28, G30 e G36) como mais próximos da estirpe tipo *S. americanum* CFNEI 156<sup>T</sup>, com um valor de bootstrap de 90%. De forma independente a bactéria G44 com um valor de bootstrap de 59% ficou próxima das estirpes tipo *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup> e *S. chiapanecum* ITTG S70<sup>T</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Árvore filogenética de Maximum-likelihood das sequências do gene *nifH* de nove estirpes de *Sinorhizobium* spp., isoladas de nódulos radiculares de glicirídia (*Gliricidia sepium*) e 12 estirpes tipo de *Sinorhizobium* (179 nucleotídeos). Os números nas ramificações são os valores de bootstrap >50% (1000 replicações). *Bradyrhizobium japonicum* USDA 2370<sup>T</sup> e *Mesorhizobium zhangyense* 23-3-2<sup>T</sup> foram incluídos como outgroups. As estirpes em estudo são mostradas em negrito. Entre parênteses: número de acesso GenBank. O modelo Jukes-Cantor foi usado para a reconstrução filogenética. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

As bactérias G18, G19, G30, G36, G51 e G52 tiveram os respectivos valores de similaridade com a estirpe tipo *S. americanum* CFNEI 156<sup>T</sup> (89,57%, 91,73%, 94,00%, 95,00%, 91,20% e 96,86%). Já as bactérias G28, G43 e G49 apresentaram valores de similaridade as estirpes tipo *S. americanum* CFNEI 156<sup>T</sup> (87,67%, 91,84% e 94,50% respectivamente) e *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup> (88,05%, 91,49% e 94,50 respectivamente) (Tabela 4).

A bactéria G10 apresentou similaridade de 97,22% com as estirpes tipo *S. mexicanum* e *S. chiapanecum* e a bactéria G44 com similaridade de 94,97% com as estirpes tipo *S. mexicanum* ITTG R7<sup>T</sup> e *S. americanum* CFNEI 156<sup>T</sup>.

**Tabela 4.** Identificação baseada no sequenciamento parcial do gene *nifH* de 11 bactérias isoladas de nódulos radiculares de glicirídia (*Gliricidia sepium*).

Estirpes	Extensão (pb)	Sequências mais similares - GenBank		
		Espécie	Similaridade	Nº de Acesso
G10	111	<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	97.22	CP041240
		<i>S. chiapanecum</i> ITTG S70 <sup>T</sup>		EU291980
G18	276	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	89.57	AF506514
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>		CP041240
G19	281	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	91.73	AF506514
		<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>		AF506514
G28	292	<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	88.05	CP041240
		<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>		AF506514
G30	202	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	94.00	AF506514
G36	203	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	95.00	AF506514

G43	280	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	91.84	AF506514
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	91.49	CP041240
G44	199	<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>	94.97	CP041240
G49	200	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	94.50	AF506514
		<i>S. mexicanum</i> ITTG R7 <sup>T</sup>		CP041240
G51	286	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	91.20	AF506514
G52	191	<i>S. americanum</i> CFNEI 156 <sup>T</sup>	96.86	AF506514

## 4.2 Avaliação do efeito da coinoculação de *Sinorhizobium* com as estirpes referências BR 8801 e 8802 em *Gliricidia sepium*

### 4.2.1 Experimento I: vasos com solo estéril

Os controles sem inoculação e sem N e com N mineral não apresentaram nodulação, indicando que não houve contaminação no experimento. Os controles positivos inoculados com *Rhizobium* sp. (BR 8802 e BR 8802), estirpes aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculante para gliricídia no Brasil, nodularam eficientemente, demonstrando que as condições de cultivo foram favoráveis para nodulação e fixação biológica de nitrogênio.

**Tabela 5.** Valores médios para massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca nódulos (MSN), teor de N (Teor N), nitrogênio total (N total) e eficiência nodular (Ef nodular). Os tratamentos foram coinoculações e inoculações com as estirpes isoladas de nódulos de gliricídia, oriundas de diferentes solos do Semiárido Nordeste e duas estirpes referências autorizadas pelo MAPA. Dois controles não inoculados, um com N mineral (50 mg L<sup>-1</sup>) e outro sem N mineral

TRATAMENTOS		MSPA	MSR	NN	MSN	Teor N	N Total	Ef. Nodular
		g planta <sup>-1</sup>		nod planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg N mg nod <sup>-1</sup>
T1	BR 8801+BR 8802	2,14 a	1,88 a	30 a	0,40 b	27,4 a	58,2 b	150,8 a
T2	G 10+8801	1,77 a	2,24 a	28 a	0,26 b	28,6 a	50,9 b	199,2 a
T3	G 18+8801	1,62 a	1,43 a	32 a	0,81 a	25,8 a	41,9 c	115,1 a
T4	G 19+8801	2,19 a	1,60 a	33 a	0,31 b	24,9 a	54,5 b	173,4 a
T5	G 28+8801	1,53 a	1,85 a	48 a	0,21 b	25,4 a	39,8 c	186,1 a
T6	G 30+8801	1,91 a	2,10 a	25 a	0,21 b	24,3 a	46,8 b	218,7 a
T7	G 36+8801	1,82 a	1,97 a	40 a	0,25 b	25,3 a	46,5 b	199,0 a
T8	G 43+8801	1,74 a	1,63 a	28 a	0,26 b	23,0 a	40,4 c	169,3 a
T9	G 44+8801	1,95 a	1,67 a	42 a	0,28 b	27,6 a	53,2 b	191,4 a
T10	G 49+8801	1,94 a	1,90 a	37 a	0,29 b	25,6 a	48,4 b	171,4 a
T11	G 51+8801	1,69 a	2,20 a	32 a	0,22 b	30,8 a	52,4 b	239,7 a
T12	G 52+8801	2,08 a	2,14 a	29 a	0,36 b	28,9 a	61,2 b	177,7 a
T13	G 10+8802	2,12 a	1,62 a	32 a	0,32 b	28,9 a	60,8 b	204,8 a
T14	G 18+8802	1,47 a	1,63 a	28 a	0,23 b	23,3 a	35,3 c	158,7 a
T15	G 19+8802	0,97 a	1,83 a	31 a	0,18 b	28,0 a	27,2 c	159,9 a
T16	G 28+8802	1,31 a	1,65 a	29 a	0,21 b	27,8 a	41,3 c	173,5 a
T17	G 30+8802	0,98 a	1,07 a	23 a	0,16 b	27,1 a	26,7 c	166,8 a
T18	G 36+8802	1,68 a	2,02 a	30 a	0,28 b	25,1 a	41,8 c	149,7 a
T19	G 43+8802	1,26 a	1,17 a	31 a	0,27 b	29,8 a	38,5 c	220,0 a
T20	G 44+8802	1,28 a	1,08 a	15 a	0,17 b	28,9 a	37,0 c	216,7 a
T21	G 49+8802	1,31 a	1,57 a	47 a	0,37 b	26,6 a	34,1 c	109,3 a
T22	G 51+8802	1,63 a	1,79 a	41 a	0,28 b	29,5 a	47,7 b	164,9 a
T23	G 52+8802	0,93 a	0,97 a	20 a	0,14 b	27,6 a	26,4 c	165,4 a
T24	G 10	1,83 a	2,18 a	44 a	0,83 a	25,5 a	46,5 b	60,8 b
T25	G 18	1,90 a	1,58 a	51 a	0,31 b	31,4 a	58,1 b	255,3 a
T26	G 19	2,01 a	1,79 a	41 a	0,69 a	25,8 a	53,0 b	90,0 a
T27	G 28	1,66 a	1,57 a	24 a	0,74 a	24,7 a	40,6 c	64,9 b
T28	G 30	1,65 a	1,65 a	39 a	0,95 a	26,7 a	46,4 b	202,6 a
T29	G 36	1,92 a	1,53 a	25 a	0,66 a	27,6 a	52,4 b	378,4 a
T30	G 43	1,88 a	1,84 a	32 a	0,92 a	26,7 a	51,3 b	110,9 a
T31	G 44	1,76 a	1,85 a	54 a	1,11 a	29,1 a	49,5 b	68,3 b
T32	G 49	1,91 a	1,83 a	28 a	0,92 a	27,7 a	52,7 b	139,4 a
T33	G 51	1,26 a	1,24 a	22 a	0,25 b	22,8 a	29,2 c	117,0 a
T34	G 52	1,73 a	1,70 a	23 a	0,22 b	29,4 a	51,0 b	235,6 a
T35	BR 8801	1,58 a	1,99 a	20 a	0,18 b	25,4 a	40,9 c	220,1 a
T36	BR 8802	1,45 a	1,42 a	39 a	0,28 b	28,0 a	40,5 c	142,8 a
T37	TN	3,77 a	2,12 a	0,0 b	0,00 b	36,6 a	134,2 a	0,0 c
T38	TA	0,50 a	0,91 a	0,0 b	0,00 b	20,9 a	10,5 c	0,0 c
CV (%)	-	27,76	29,14	4,02	30,85	12,74	31,24	2,09

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ( $p>0,05$ ).

Neste ensaio as variáveis número de nódulos (NN), massa seca da raiz (MSR), nitrogênio total (N total) e eficiência nodular (Ef Nodular) foram significativas a 5% de probabilidade pelo teste de *Scott-Knott*.

Em relação a variável NN, todos os tratamentos inoculados e coinoculados foram estatisticamente similares as BR 8801 e 8802. Já para massa seca de nódulos (MSN) o tratamento coinoculado T3 e os inoculados T24, T26, T27, T28, T29, T30, T31 e T32 obtiveram valores superiores aos demais tratamentos, inclusive maiores do que as referências BR 8801 e 8802. Os valores variaram entre 0,66 mg planta<sup>-1</sup> (T29) a 1,11 mg planta<sup>-1</sup> (T31). O menor valor foi do tratamento T23 (G52+8802) com 0,14 mg planta<sup>-1</sup>.

Com relação ao N total somente o tratamento suplementado com N mineral apresentou valor estatisticamente superior a todos os tratamentos com expressivos 134,2 mg planta<sup>-1</sup>. Os tratamentos inoculados T1, T2, T4, T6, T7, T9, T10, T11, T12, T13 e T22, e os tratamentos coinoculados T24, T26, T28, T29, T30, T31, T32 e T34 obtiveram valores superiores ao da testemunha absoluta. Os demais tratamentos apresentaram valores similares ao da testemunha absoluta e das referências BR 8801 e 8802.

Com relação à eficiência nodular, com exceção dos tratamentos T24, T27 e T31 que foram significativamente inferiores, todos apresentaram valores estatísticos similares as BR 8801 e 8802.

#### 4.2.2 Experimento II: vasos com solo não estéril

O segundo experimento teve os mesmos tratamentos testados no experimento I, porém, nesse caso utilizando como substrato, amostra de solo não esterilizado.

**Tabela 6.** Valores médios para massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca nódulos (MSN), teor de N (Teor N), nitrogênio total (N total) e eficiência nodular (Ef nodular). Os tratamentos foram coinoculações e inoculações com as estirpes isoladas de nódulos de gliricídia, oriundas de diferentes solos do Semiárido Nordeste e duas estirpes referências autorizadas pelo MAPA. Dois controles não inoculados, um com N mineral (50 mg L<sup>-1</sup>) e outro sem N mineral

TRATAMENTOS		MSPA	MSR	NN	MSN	Teor N	N Total	Ef. Nodular
		g planta <sup>-1</sup>		nod planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg N mg nod <sup>-1</sup>
T1	BR 8801+BR 8802	1,32 b	2,18 a	13 b	0,14 b	7,1 e	9,5 c	70,4 b
T2	G 10+8801	2,04 b	2,61 a	22 a	0,16 b	18,6 b	38,3 a	233,9 a
T3	G 18+8801	1,05 b	2,10 a	8 b	0,09 b	15,8 c	17,4 c	215,5 a
T4	G 19+8801	1,17 b	1,40 b	6 b	0,09 b	17,5 b	20,1 b	258,8 a
T5	G 28+8801	1,56 a	1,68 b	15 b	0,08 b	19,1 b	29,9 b	480,9 a
T6	G 30+8801	1,42 b	2,06 a	17 a	0,10 b	19,6 b	28,4 b	295,5 a
T7	G 36+8801	1,11 b	1,32 b	19 a	0,12 b	15,0 c	17,9 c	143,6 a
T8	G 43+8801	0,71 b	1,59 b	10 b	0,05 b	13,9 c	10,3 c	275,7 a
T9	G 44+8801	1,31 b	2,11 a	26 a	0,11 b	17,6 b	22,8 b	255,7 a
T10	G 49+8801	1,39 b	1,66 b	20 a	0,12 b	19,8 b	28,6 b	307,8 a
T11	G 51+8801	1,21 b	1,95 a	11 b	0,09 b	15,0 c	17,9 c	202,8 a
T12	G 52+8801	1,01 b	1,20 b	11 b	0,07 b	15,5 c	15,7 c	318,2 a
T13	G 10+8802	1,39 b	2,04 a	33 a	0,13 b	19,3 b	26,8 b	206,6 a
T14	G 18+8802	0,65 b	1,05 b	1 b	0,02 b	12,0 d	7,7 c	337,4 a
T15	G 19+8802	0,85 b	1,30 b	11 b	0,07 b	16,2 b	14,3 c	294,9 a
T16	G 28+8802	2,39 a	1,93 a	4 b	15,58 a	11,9 d	26,9 b	77,8 b
T17	G 30+8802	1,10 b	2,36 a	20 a	0,13 b	7,2 e	8,0 c	62,1 b
T18	G 36+8802	1,90 a	2,13 a	27 a	0,17 b	5,8 e	11,0 c	66,3 b
T19	G 43+8802	1,00 b	1,74 a	11 b	0,11 b	6,1 e	6,3 c	62,8 b
T20	G 44+8802	1,09 b	2,03 a	31 a	0,16 b	7,2 e	7,8 c	50,6 b
T21	G 49+8802	0,73 b	1,48 b	13 b	0,08 b	6,2 e	4,7 c	53,9 b
T22	G 51+8802	1,41 b	2,14 a	21 a	0,15 b	6,3 e	9,1 c	60,2 b
T23	G 52+8802	1,25 b	1,74 a	20 a	0,09 b	6,2 e	7,8 c	78,8 b
T24	G 10	1,42 b	1,97 a	17 a	0,15 b	18,3 b	27,0 b	167,6 a
T25	G 18	1,22 b	2,36 a	23 a	0,14 b	12,9 c	15,8 c	156,7 a
T26	G 19	1,36 b	1,99 a	31 a	0,13 b	16,9 b	22,5 b	228,8 a
T27	G 28	1,35 b	1,82 a	17 b	0,10 b	15,1 c	20,6 b	180,6 a
T28	G 30	1,33 b	1,89 a	28 a	0,13 b	16,7 b	22,6 b	183,8 a
T29	G 36	1,62 a	2,44 a	23 a	0,16 b	15,1 c	24,1 b	161,5 a
T30	G 43	0,66 b	1,36 b	8 b	0,05 b	16,9 b	11,1 c	1497,5 a
T31	G 44	1,28 b	2,04 a	10 b	0,06 b	18,7 b	23,8 b	212,5 a
T32	G 49	1,26 b	1,80 a	21 a	0,14 b	13,3 c	17,1 c	126,8 b
T33	G 51	1,05 b	1,33 b	14 b	0,08 b	16,1 c	16,6 c	329,1 a
T34	G 52	0,95 b	1,84 a	18 b	0,07 b	15,5 c	16,0 c	209,0 a
T35	BR 8801	1,18 b	1,92 a	9 b	0,11 b	16,7 b	19,9 b	177,0 a
T36	BR 8802	0,82 b	1,35 b	12 b	0,03 b	13,0 c	10,1 c	394,5 a
T37	TN	1,15 b	1,21 b	00 b	0,00 b	35,1 a	40,3 a	0,0 b
T38	TA	0,75 b	1,64 b	6 b	0,07 b	18,5 b	14,0 c	227,2 a
CV (%)	-	29,86	25,74	25,03	26,03	14,67	39,60	2,09

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p>0,05$ ).

Neste ensaio todas as variáveis analisadas mostraram resultados significativos a 5% de probabilidade pelo teste de *Scott-Knott*. Em algumas variáveis analisadas observaram-se tratamentos coinoculados e inoculados estatisticamente superiores aos tratamentos controles.

Para a variável MSPA os tratamentos coinoculados T5, T16 e T18 e o tratamento inoculado T29 obtiveram valores superiores aos dos tratamentos das estirpes referencias BR 8801 e 8802, controle nitrogenado e tratamento absoluto. Os valores variaram entre 1,56 a 2,39 g planta<sup>-1</sup>, tratamentos T5 e T16, respectivamente. O restante dos tratamentos apresentaram valores estatísticos similares aos da referencias BR 8801 e 8802, TA e TN.

A MSR os tratamentos inoculados T24, T25, T26, T27, T28, T29, T21, T22 e BR 8801, e os tratamentos coinoculados T1, T2, T3, T16, T17, T18, T19, T20, T32 e T33 obtiveram valores superiores ao tratamento absoluto, com N mineral e BR8802. O restante dos tratamentos não diferiram entre si.

No número de nódulos 11 (T2, T6, T7, T9, T10, T13, T17, T18, T20, T22 e T23) dos 23 tratamentos coinoculados e seis (T24, T25, T26, T28, T29 e T32) dos 11 tratamentos inoculados apresentaram valores estatisticamente superiores a BR 8801 e 8802. Já para a variável massa seca dos nódulos somente o tratamento T16 que corresponde a coinoculação G28+8802 obteve resultado positivo superior (15,58 mg planta<sup>-1</sup>) em relação aos tratamentos controles.

Com relação ao teor de nitrogênio nenhum dos tratamentos coinoculados e inoculados apresentou valores superiores ao tratamento nitrogenado. Dos 23 tratamentos coinoculados, oito tratamentos sendo eles T2, T4, T5, T6, T9, T10, T13 e T15 e cinco tratamentos inoculados (T24, T26, T28, T30 e T31) obtiveram valores similares ao da BR 8801 e testemunha absoluta. Todos os outros tratamentos apresentaram valores abaixo aos dos tratamentos controles.

O valor mais expressivo de nitrogênio total (N total) foi para o tratamento coinoculado T2 (G10+8801) com 38,5 mg planta<sup>-1</sup>, este foi o único tratamento que estatisticamente ficou similar a testemunha nitrogenada (TN) (40,3 mg planta<sup>-1</sup>). Os tratamentos coinoculados T4, T5, T6, T9, T10, T13 e T16 e os tratamentos inoculados T24, T26, T27, T28, T29 e T31 obtiveram valores abaixo da testemunha nitrogenada, contudo apresentaram valores similares aos da BR 8801 e superiores ao da testemunha absoluta. Os demais tratamentos, incluindo a BR 8802 obtiveram resultados similares à testemunha absoluta.

Com relação à eficiência nodular os tratamentos coinoculados T1, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22 e T23, e o tratamento inoculado T32 apresentaram resultados estatísticos

inferiores comparados à testemunha absoluta e as BR 8801 e 8802, todos os outros tratamentos obtiveram valores estatísticos similares a BR 8801 e 8802.

Os parâmetros massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN), Teor de nitrogênio (Teor de N), Nitrogênio total e Eficiência nodular do experimento de eficiência simbiótica em casa de vegetação foram representados em gráficos em uma análise conjunta comparando cada média dos tratamentos inoculados e coinoculados com o tratamento controle.

Na MSPA os tratamentos de inoculação G10, G19, G28, G36, G44, G49 e G52 diferiram significativamente do tratamento controle. Todos os tratamentos coinoculados com a BR 8801, com exceção da G28 diferiram do controle, enquanto que apenas as coinoculações com a BR 8802, G10+8802, G49+8802 e G51+8802 foram significativamente diferentes (Figura 4).

Para MSR somente os tratamentos inoculados G10, G36, G44 e G49 foram estatisticamente diferentes do tratamento controle. Houve diferença do tratamento controle também as coinoculações com a BR 8801 (G10, G30, G49, G51 e G52). Somente as coinoculações G10+8802, G18+8802 e G36+8802 diferiram estatisticamente do controle. Tanto as inoculações das bactérias G19, G28 e G43, quanto suas respectivas coinoculações com as BR 8801 e 8802 não diferiram do tratamento controle (Figura 5).

Com relação ao parâmetro número de nódulos (NN) os tratamentos de inoculação G19, G28, G36, G43 e G52 diferiram do controle. Os tratamentos coinoculados com a BR 8801 e 8802 (G10, G18, G19, G30, G43, G44, G49 e G52) diferiram significativamente do controle, enquanto que a coinoculação com G36 não diferiu em nenhum dos casos. As coinoculações G51+8801 e G28+8802 também foram estatisticamente diferentes do tratamento controle). Este parâmetro foi o único em que a bactéria G10 inoculada sozinha não foi significativamente diferente do tratamento controle (Figura 6).

Para o parâmetro MSN as inoculações G10, G19, G28 e G52 tiveram diferença com relação ao tratamento controle. Os tratamentos coinoculados com ambas as BR 8801 e 8801 (G10, G19, G30, G44, G49, G51 e G52) diferiram do tratamento controle, enquanto que as bactérias G28 e G43 coinoculadas com a BR 8801 e G18 e G36 com a BR 8802 diferiram significativamente (Figura 7).

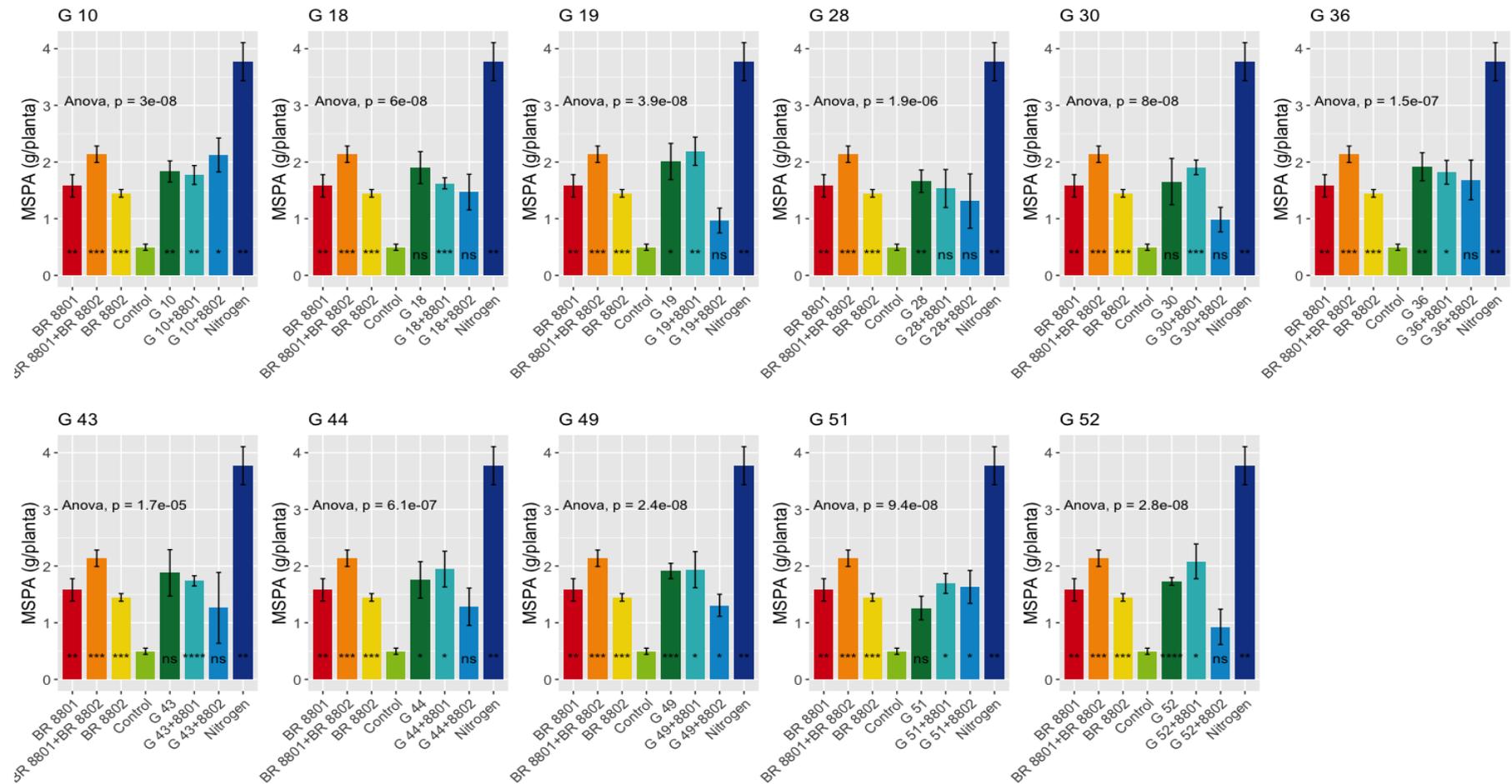
Com relação ao Teor de N os tratamentos inoculados G10, G19, G36, G43, G44, G49 e G52 diferiram significativamente do tratamento controle. As coinoculações com ambas as BR 8801 e 8802 (G10, G19, G44 e G52) tiveram diferenças significativas do tratamento controle. Enquanto que as bactérias G30, G36, G43, G49 e G51 coinoculadas com a BR8802

diferiam significativamente. As inoculações G18 e G28 não diferiram e nem coinoculadas com as BR 8801 e 8802 (Figura 8).

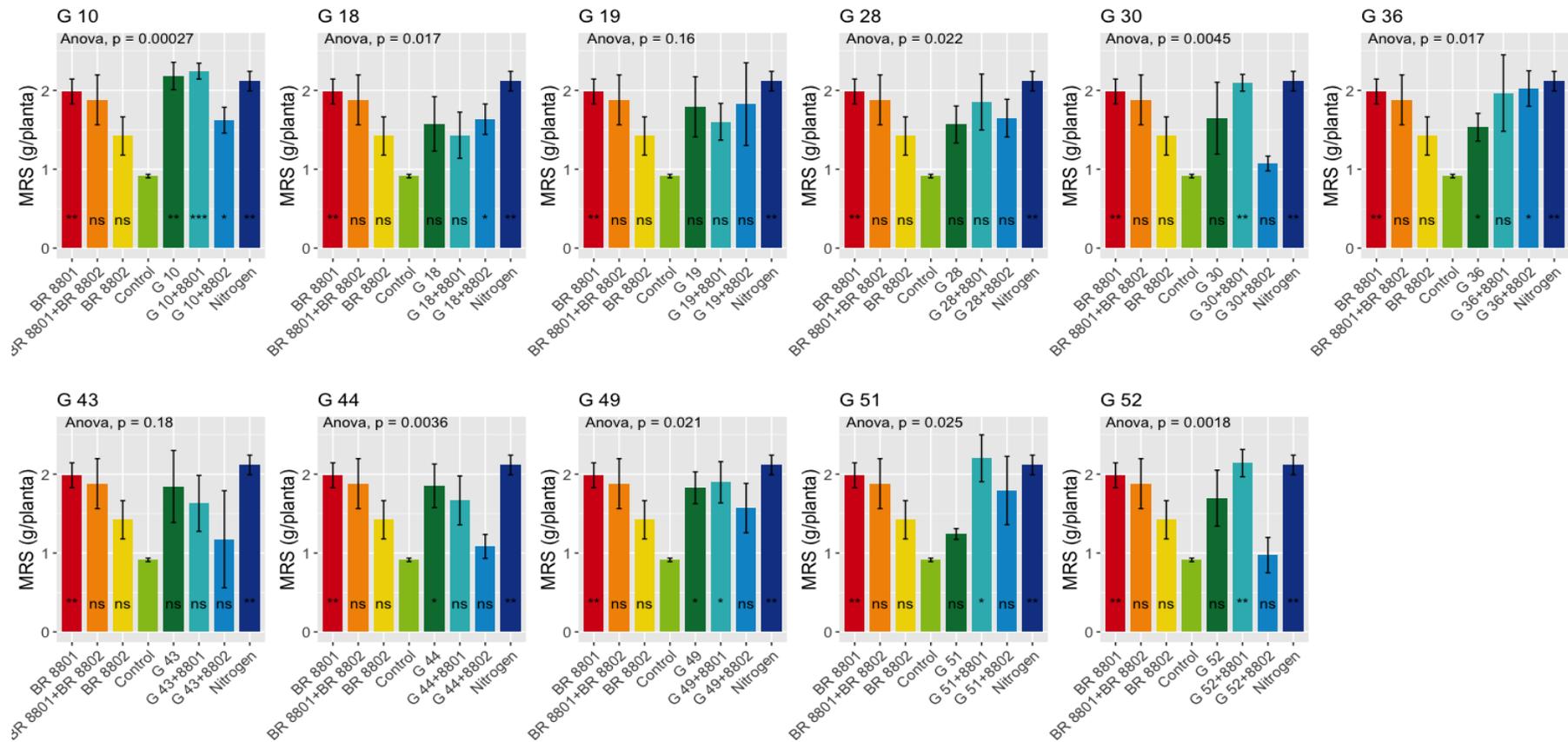
Para o N total, com exceção dos tratamentos inoculados G30, G43 e G51 todos os outros diferiram do tratamento controle. Os tratamentos coinoculados com a BR 8801 (G18, G19, G30, G43, G44 e G52) obtiveram diferenças significativas do tratamento controle. Os tratamentos coinoculados com ambas as BR 8801 e 8802 (G10, G49 e G51) também foram significativamente diferentes, enquanto que G28 e G36 não diferiram do tratamento controle quando coinoculados com as BR 8801 e 8802 (Figura 9).

A eficiência nodular dos tratamentos inoculados G10, G19, G28, G51 e G52 diferiram significativamente do tratamento controle. Todos os tratamentos coinoculados com as BR 8801 e 8802, com exceção da coinoculação G43+8802, tiveram diferenças significativas quando comparadas com o tratamento controle (Figura 10).

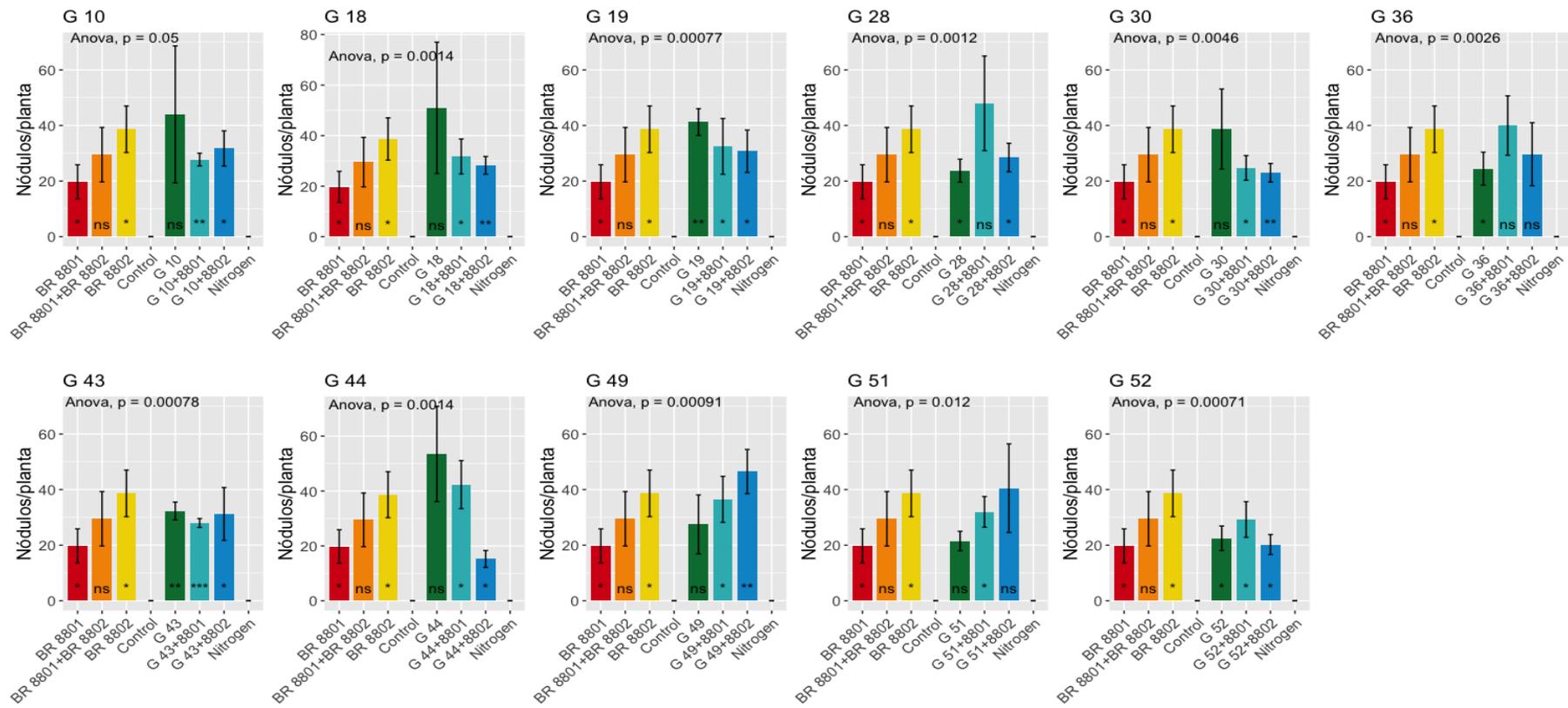
A análise componentes principais (PCA) (Figura 18) explicou 59,44% da variância no experimento em condições de solo estéril. Nenhuma variável se correlacionou, no entanto MSR, MSPA e N total ficaram mais próximos entre si.



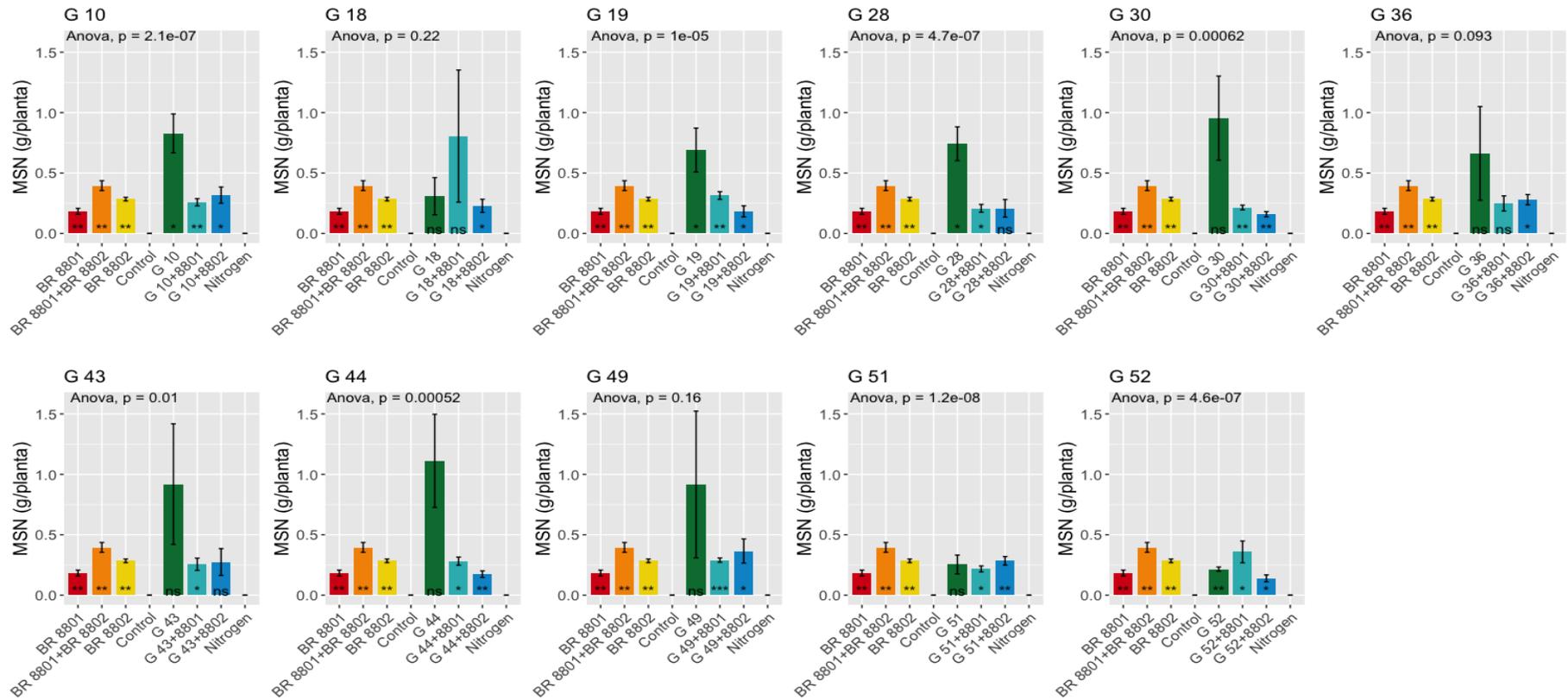
**Figura 4** Análise comparativa da massa da parte aérea seca dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



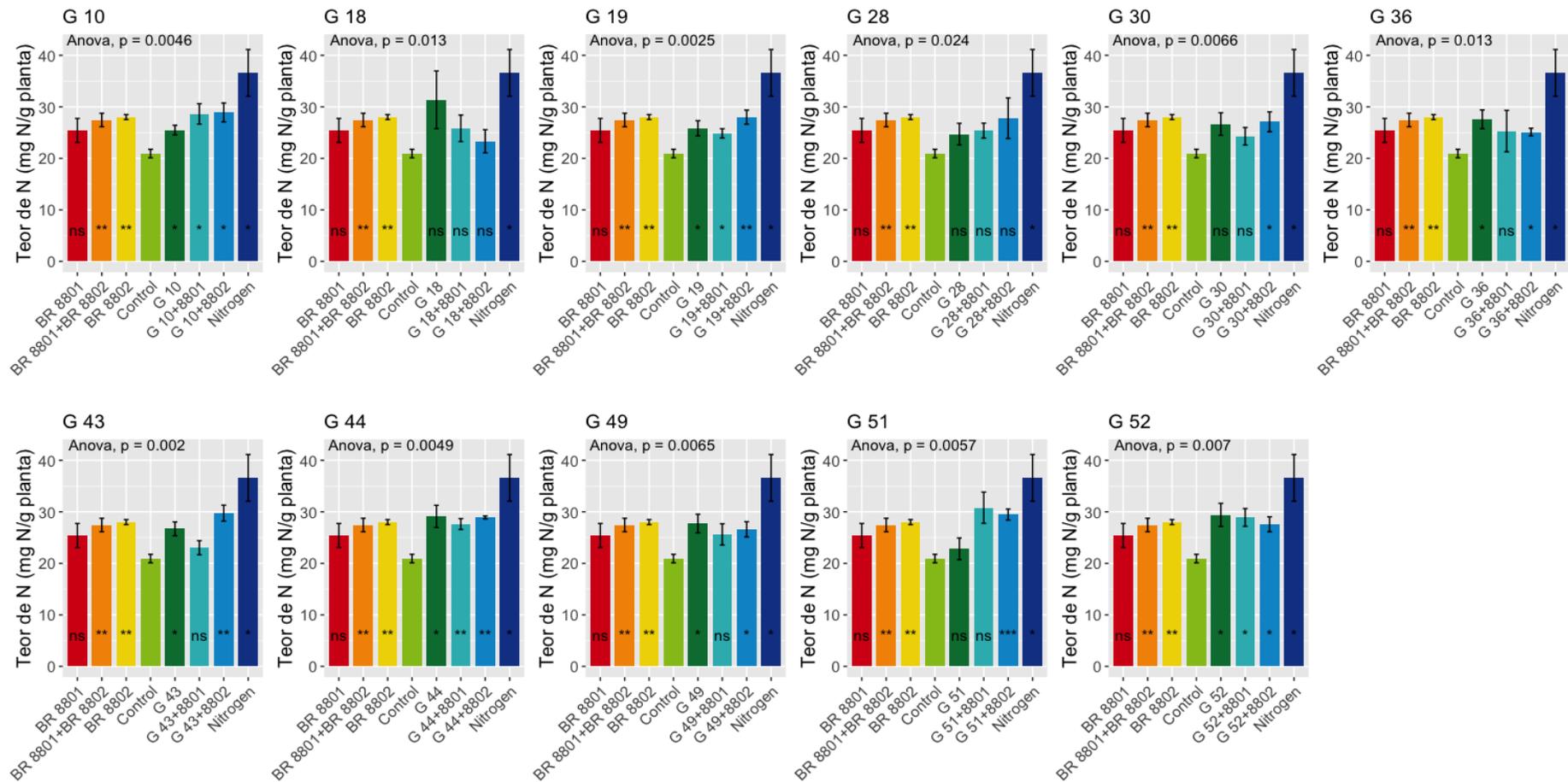
**Figura 5** Análise comparativa da massa da raiz dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



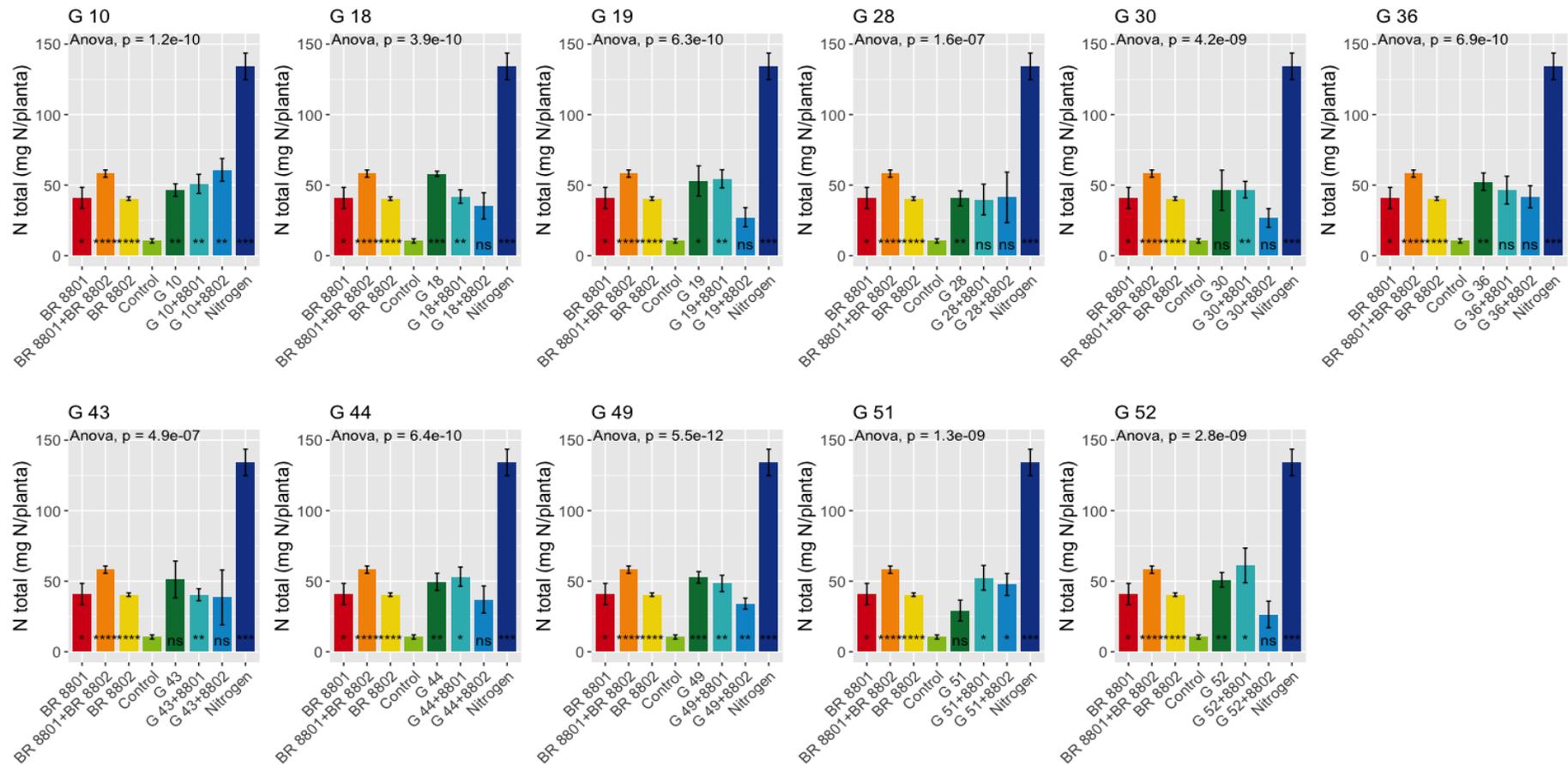
**Figura 6** Análise comparativa do número de nódulos dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



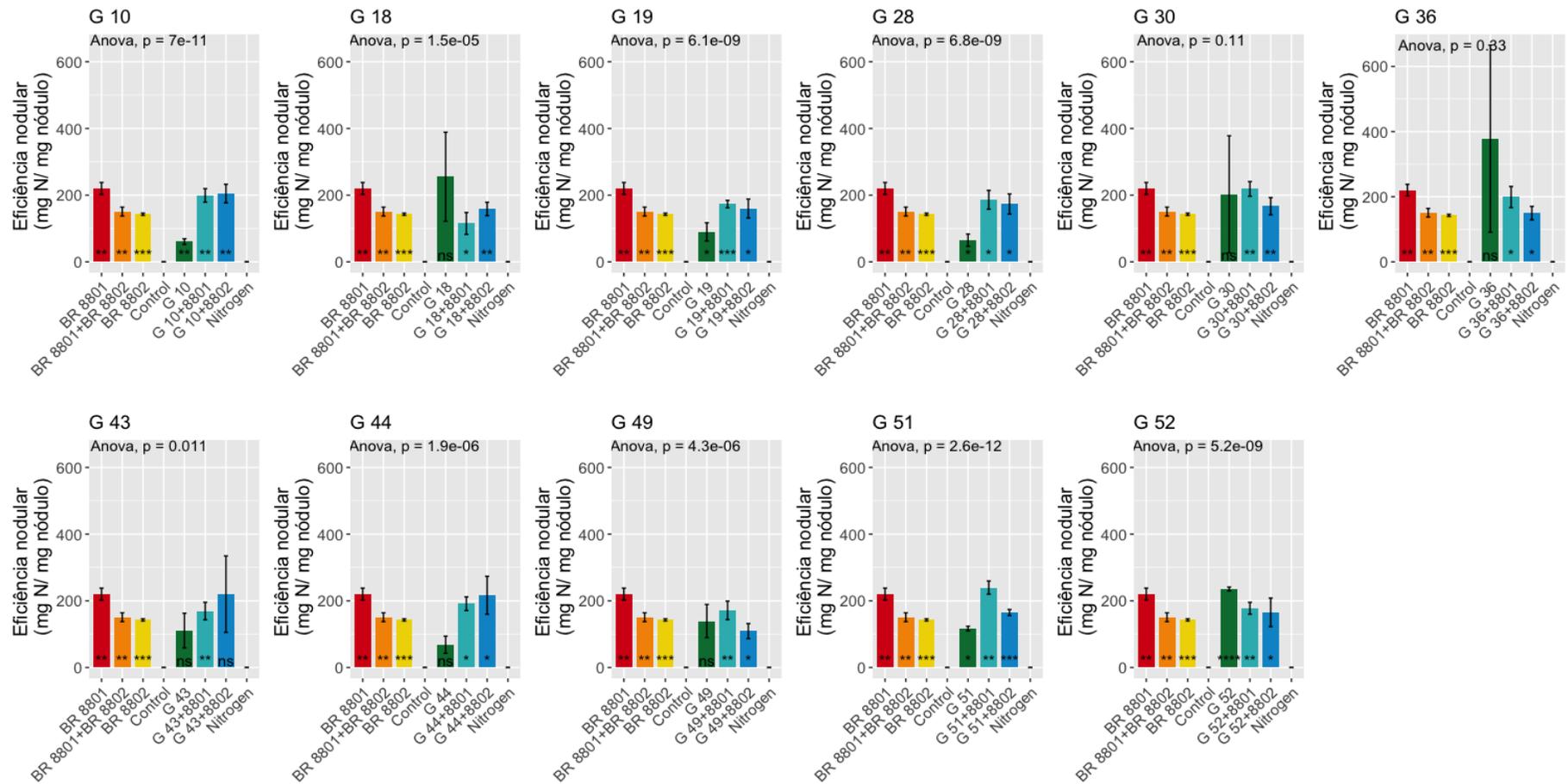
**Figura 7** Análise comparativa da massa seca dos nódulos dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 8** Análise comparativa do teor de nitrogênio dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 9** Análise comparativa do nitrogênio total dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 10** Análise comparativa da eficiência nodular dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$

Os parâmetros massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN), Teor de nitrogênio (Teor de N), Nitrogênio total e Eficiência nodular do experimento de eficiência simbiótica em viveiro foram representados em gráficos em uma análise conjunta comparando cada média dos tratamentos inoculados e coinoculados com o tratamento controle.

Para MSPA somente os tratamentos inoculados G28, G30 e G36 diferiram significativamente do tratamento controle. As coinoculações G10, G44 e G51 com a BR 8801 foi significativamente diferente. Enquanto que a coinoculação de G28 foi a única que diferiu do tratamento controle com ambas as BR 8801 e 8802 (Figura 11).

Com relação ao parâmetro MSR nenhum dos tratamentos inoculados e coinoculados diferiu significativamente do tratamento controle (Figura 12).

O NN foi significativamente diferente para as inoculações G10, G30 e G36 em relação ao tratamento controle. Já as coinoculações somente os tratamentos G10+8801, G44+8801, G49+8802 e G52+8802 diferiram do tratamento controle (Figura 13).

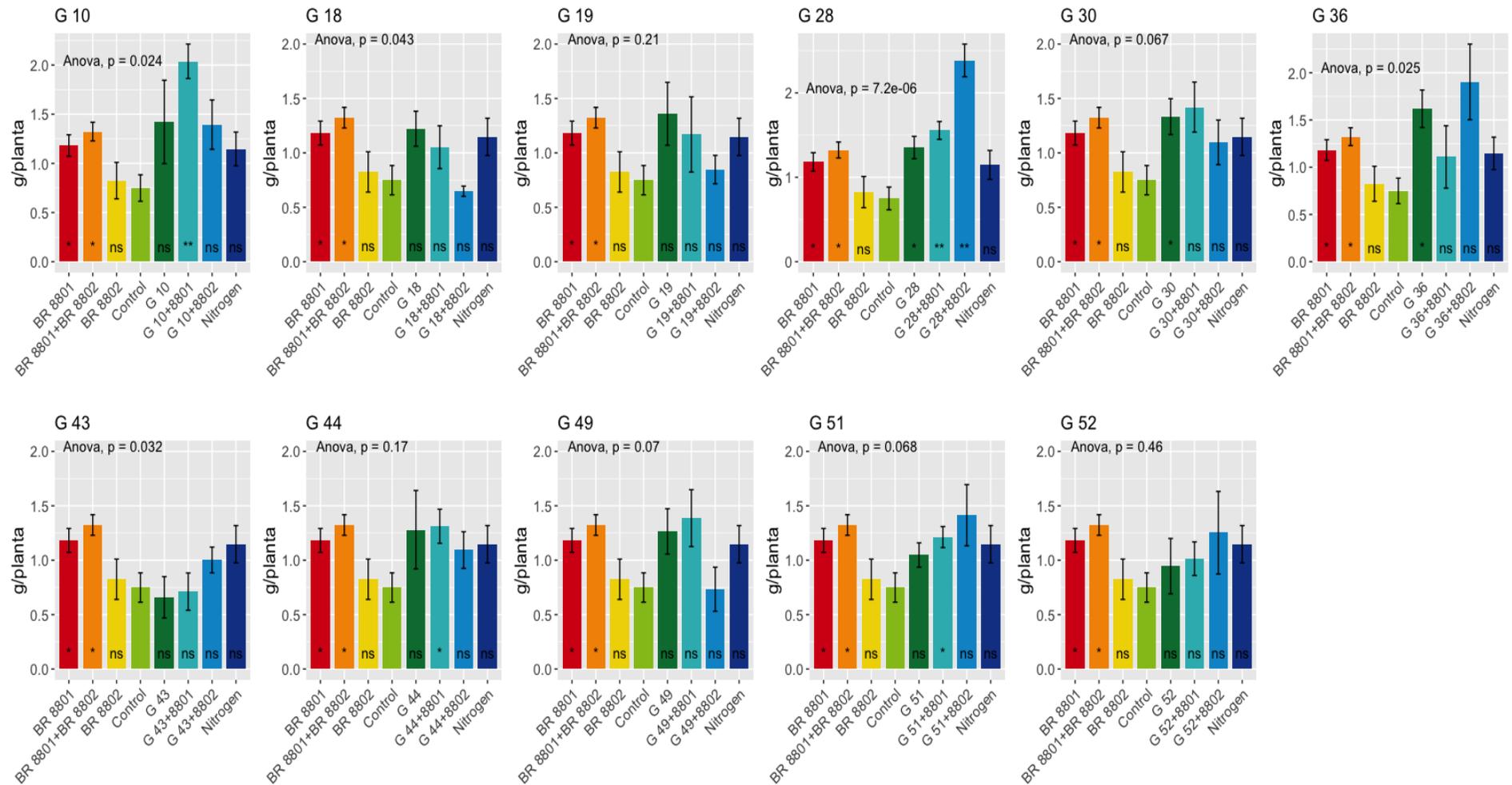
Para a MSN somente o tratamento inoculado G10 e a coinoculação G10+8801 diferiram significativamente do tratamento controle (Figura 14).

Para o teor de N somente houve diferenças significativas nas inoculações G18 e G28. As coinoculações com a BR 8802 (G18, G30, G36, G44, G49 e G51) diferiram do tratamento controle, assim como as coinoculações com ambas as BR 8801 e 8802 (G43 e G52) (Figura 15).

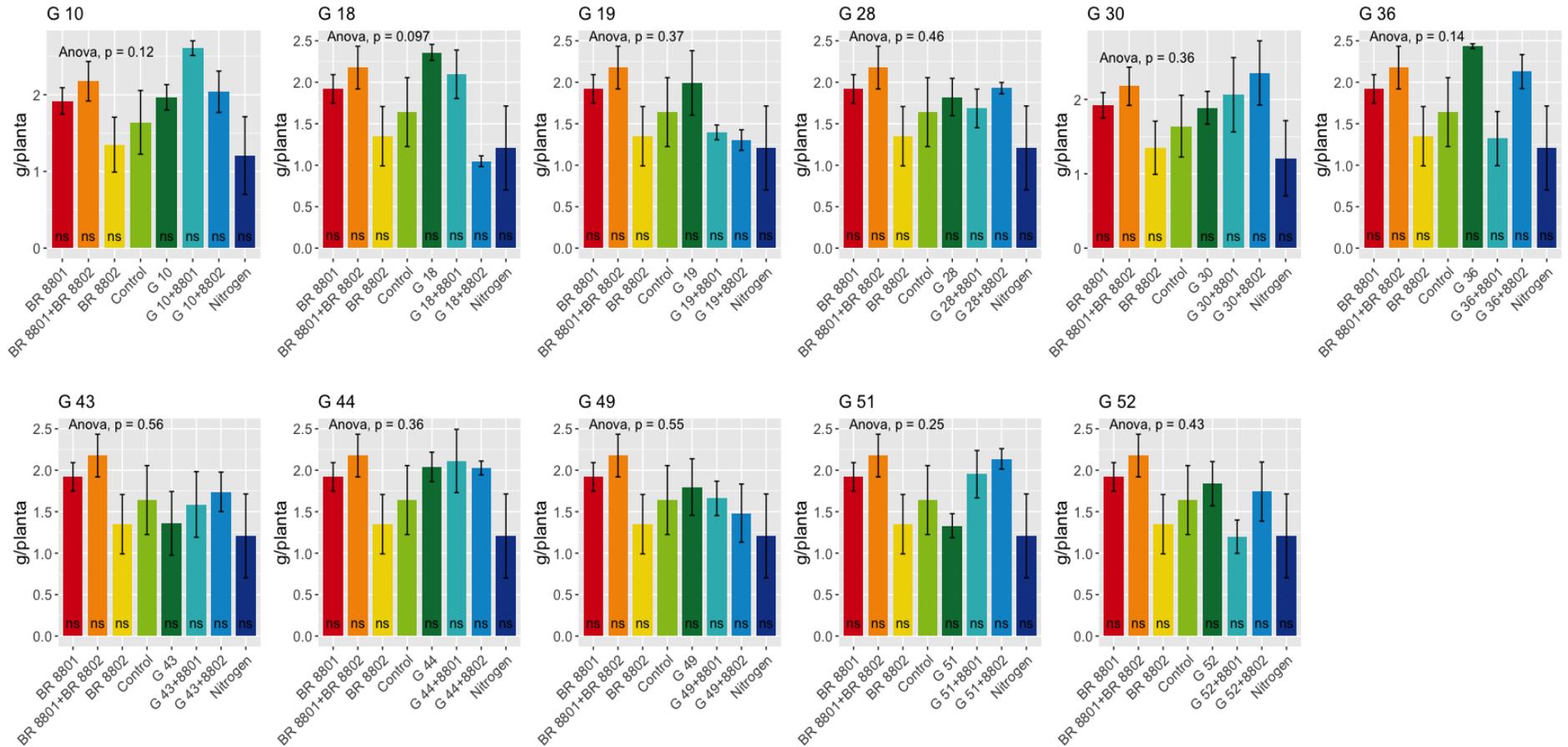
O N total não foi significativo para nenhum tratamento inoculado e para as coinoculações somente o tratamento G28+8801 foi significativo em relação ao tratamento controle (Figura 16).

No parâmetro eficiência nodular nenhum dos tratamentos inoculados diferiu significativamente do tratamento controle. Enquanto que, as coinoculações G18, G30, G36, G44, G49, G51 e G52 todas com a BR 8802 foram significativamente diferentes (Figura 17).

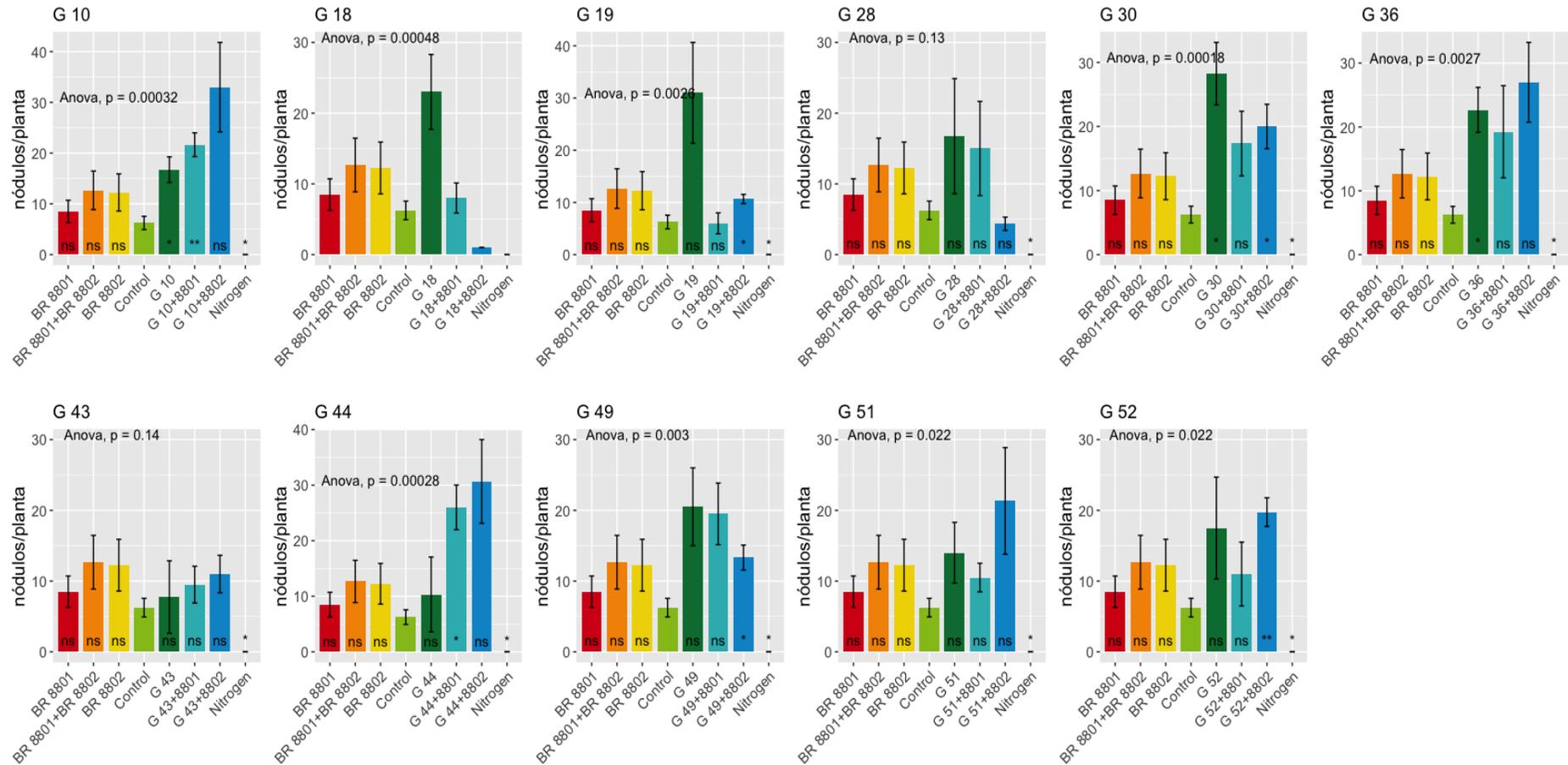
Para as variáveis número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN), na análise de componentes principais (PCA), os componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 58,38% da variância. As variáveis de nodulação (NN e MSN) correlacionaram-se entre si. (Figura 18).



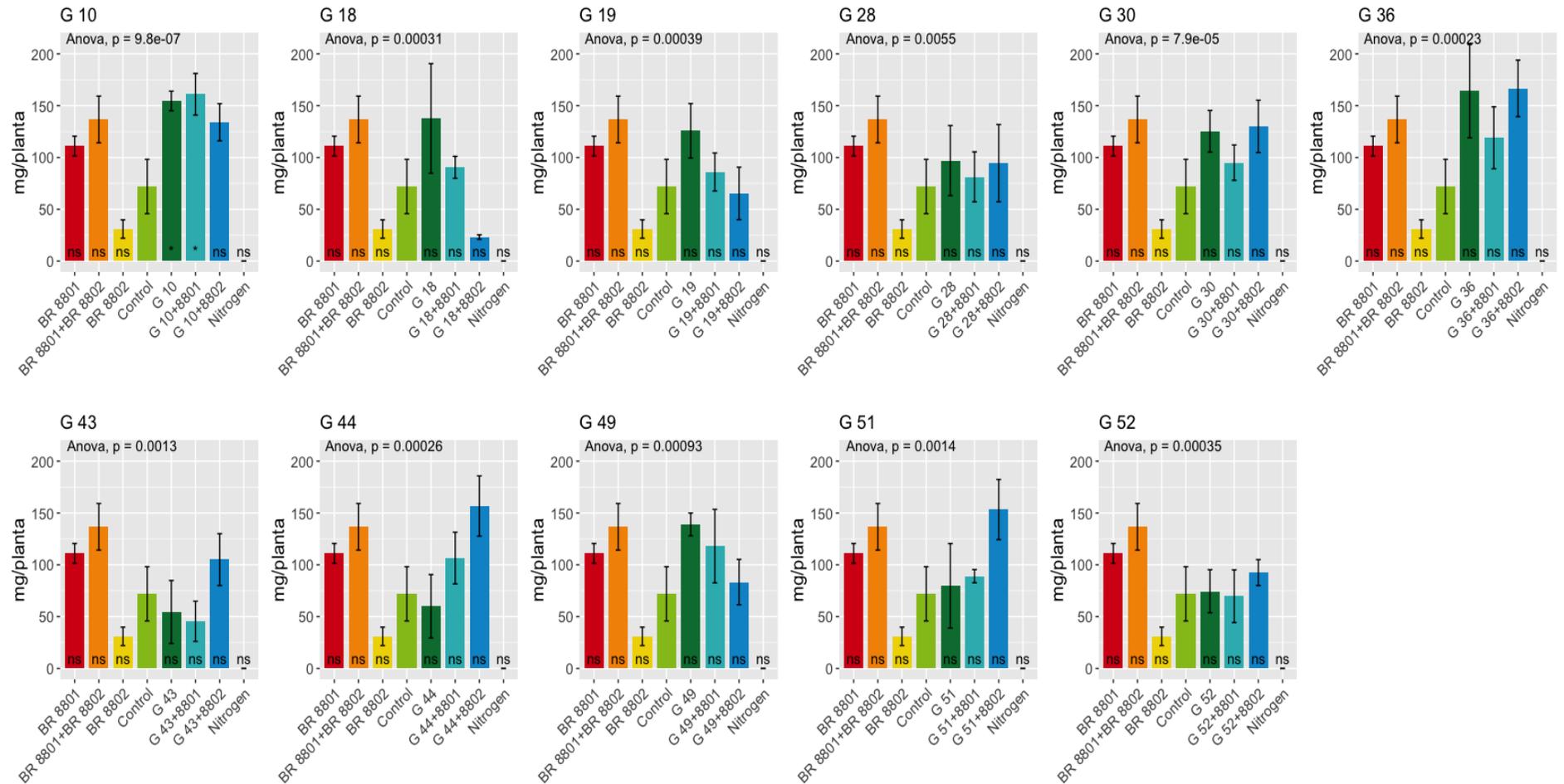
**Figura 11** Análise comparativa da massa seca da parte aérea dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



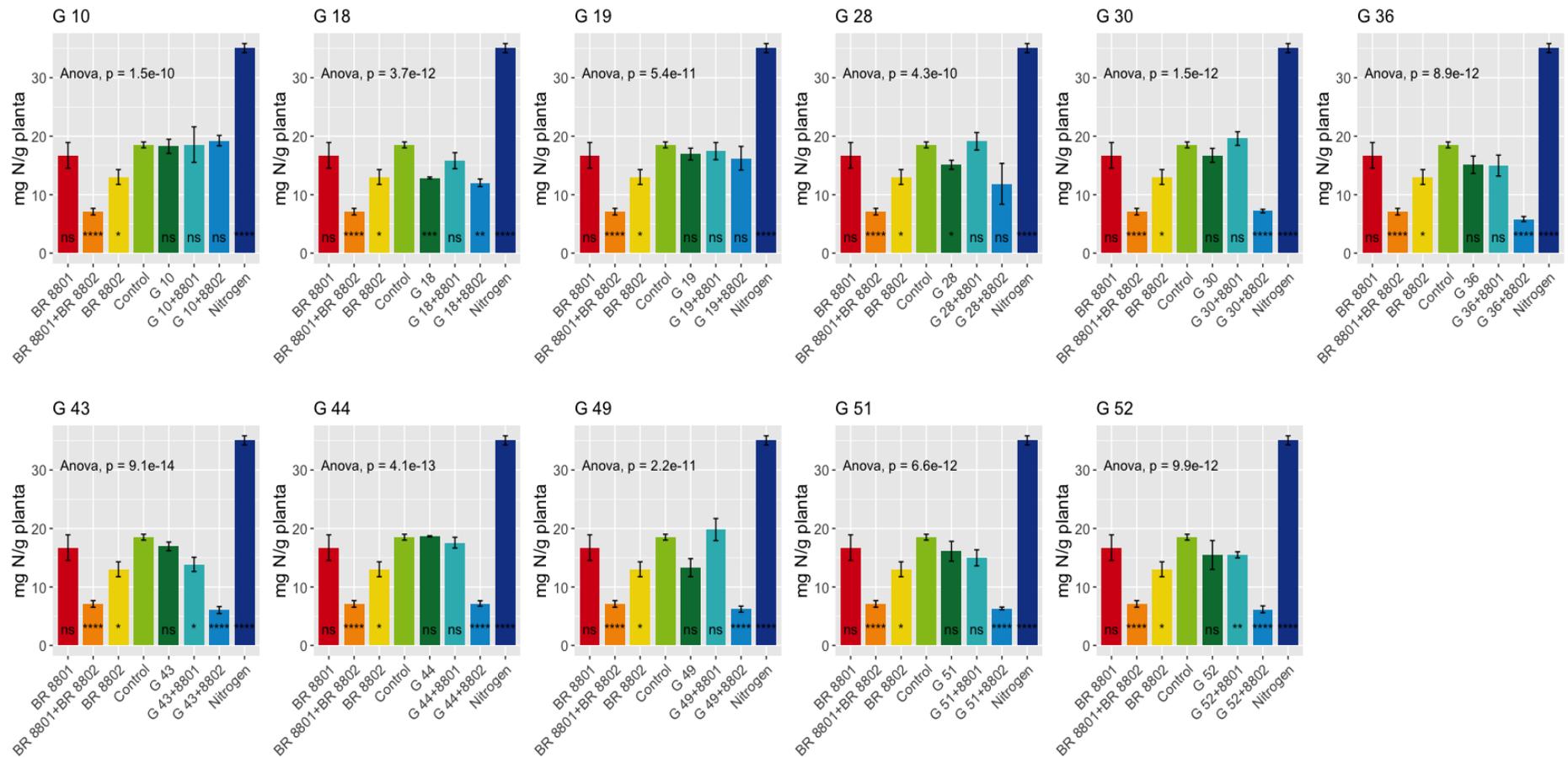
**Figura 12** Análise comparativa da massa seca da raiz dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



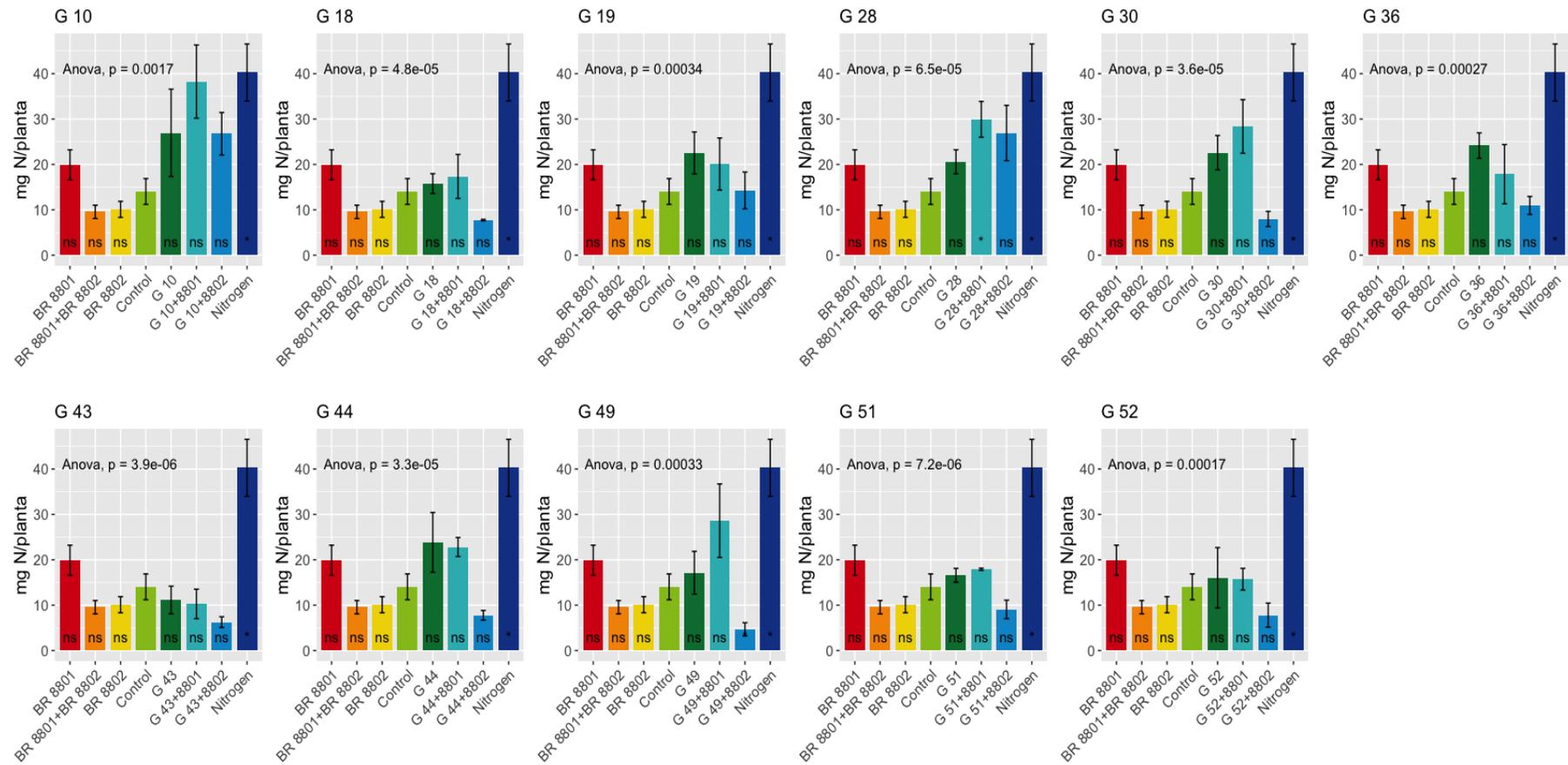
**Figura 13** Análise comparativa do número de nódulos dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



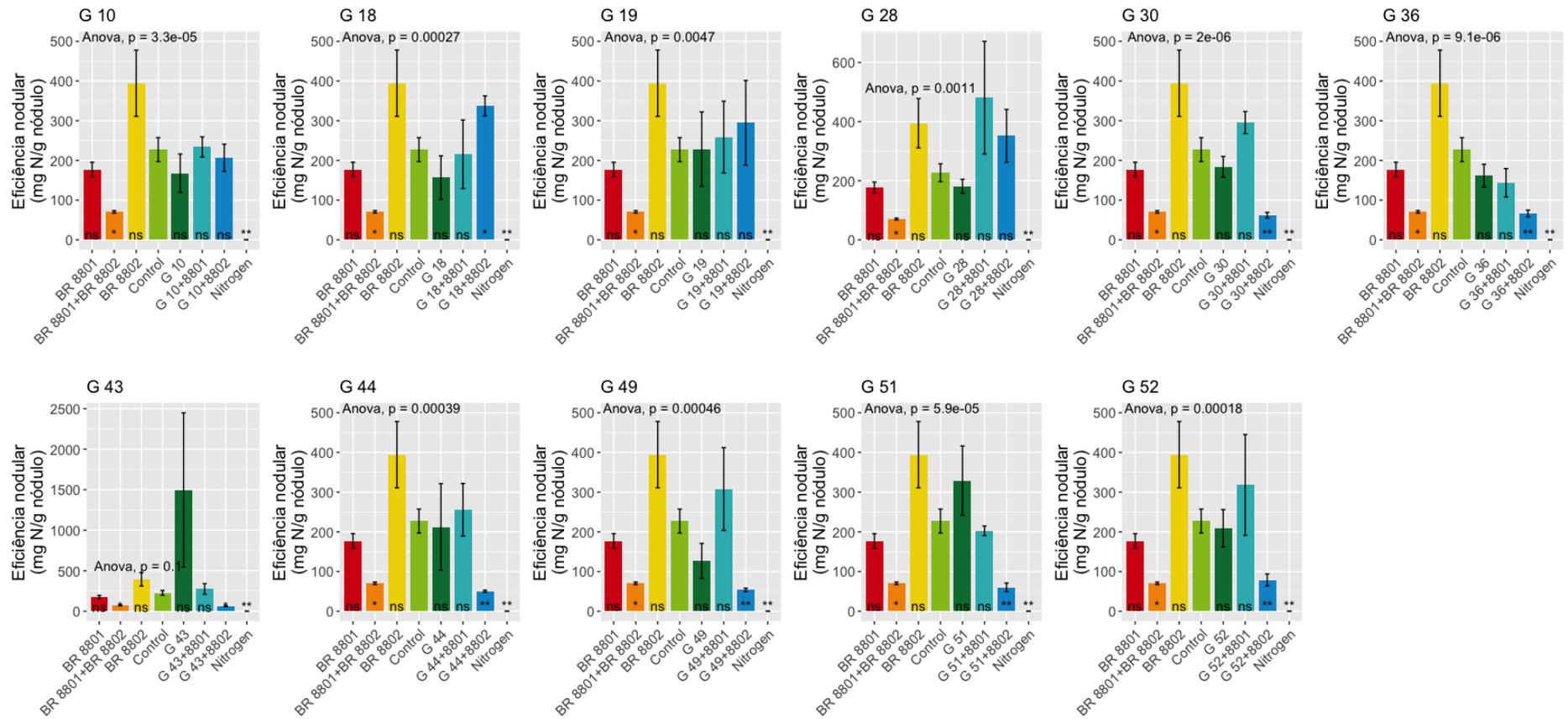
**Figura 14** Análise comparativa da massa seca dos nódulos dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



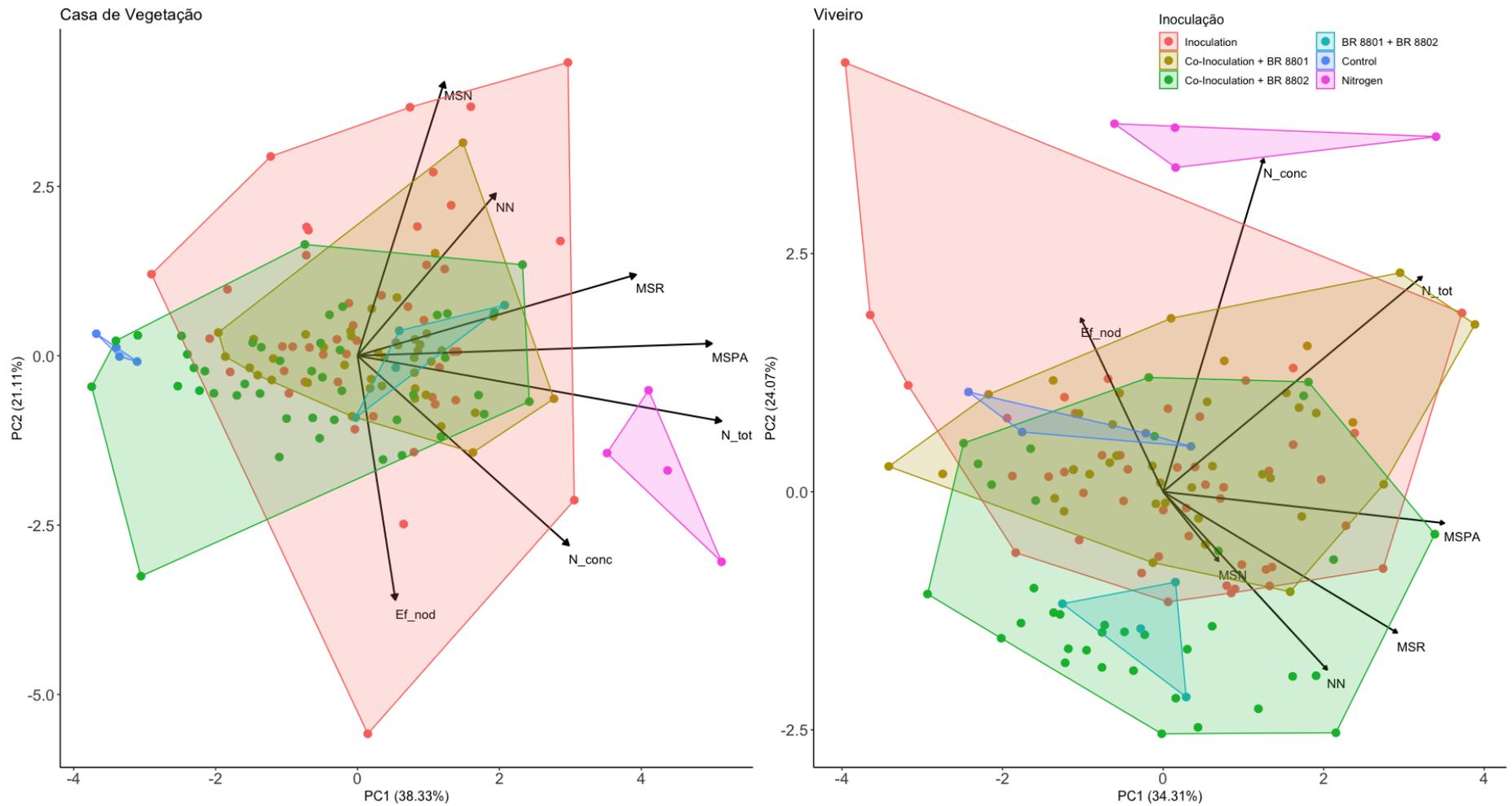
**Figura 15** Análise comparativa do teor de nitrogênio dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 16** Análise comparativa do nitrogênio total dos tratamentos contendo inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 17** Análise comparativa da eficiência nodular dos tratamentos contento inoculação com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8802 e BR 8801, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)]. Dados submetidos ao teste t pareado comparando os tratamentos apenas com om a testemunha absoluta (Control). ns = não significativo, \* =  $p < 0.1$ , \*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.05$ , \*\*\*\* =  $p < 0.001$



**Figura 18** Biplot da análise de componentes principais (PCA) realizada com os dados (todas as repetições) dos experimentos com cada estirpe de *Sinorhizobium* e BR 8801 e BR 8802, além das coinoculações de cada estirpe de *Sinorhizobium* + BR 8801, *Sinorhizobium* + BR 8802, BR 8802 + BR 8801 e tratamentos não inoculados [testemunha absoluta (Control) e nitrogenada (Nitrogen)] em condições de solo estéril (casa de vegetação) e condições de solo não estéril (viveiro). PC1 e PC2 são os componentes principais um e dois, respectivamente

## 5. DISCUSSÃO

O *gyrB* é um dos genes constitutivos com melhor capacidade de identificar estirpes de *Sinorhizobium*, devido à alta separabilidade e baixos valores de heterogeneidade, diferentemente dos genes ribossomais que exibem pouca separabilidade a nível de espécies (MARTENS et al., 2008).

Ao analisar a diversidade de rizóbios provenientes de nódulos de gliricídia de diferentes localidades, por meio de sequências do 16S rRNA PCR-RFLP, sem o uso de genes constitutivos, Acosta-Durán e Martínez-Romero (2002) constataram um grupo próximo à estirpe tipo *Sinorhizobium terangae*. O resultado do sequenciamento do gene *gyrB*, no presente trabalho, também evidenciou a presença de duas estirpes próximas a *S. terangae* provenientes de nódulos de gliricídia. De acordo com De Lajudie et al. (1994) esta é uma espécie que pode nodular espécies vegetais como *Sesbania* e *Acacia* spp., *Leucaena leucocephala* e *N. Oleracea*.

A partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, a análise filogenética com os mesmos isolados rizobianos de gliricídia revelou que, dez das onze estirpes identificadas no gênero *Sinorhizobium* formaram um único grupo com valor de bootstrap de 75%, e ficaram mais próximas as estirpes tipo *S. alkalisoli* YIC4027<sup>T</sup> e *S. arboris* HAMBI 1552<sup>T</sup> e apenas um isolado não se agrupou com nenhuma das estirpes, entretanto ficou próximo das mesmas estirpes tipo que os demais isolados, todas com valores de similaridade acima de 98,80% (SANTOS, 2022).

Mesmo com altos valores de similaridade observados no estudo realizado por Santos (2022), no presente estudo, os resultados revelam que o sequenciamento de genes constitutivos em comparação com o gene 16S rRNA, possuem um maior grau de discriminação a nível de espécies. Pois neste estudo as bactérias G10 e G44 agruparam-se as estirpes tipo *S. terangae* LMG7834<sup>T</sup> e *S. xinjiangense* CCBAU110<sup>T</sup>, e não a *S. arboris* HAMBI 1552<sup>T</sup> como mostrou na análise do 16S rRNA. Em comparação com o gene 16S rRNA, o maior grau de divergência de sequência de genes constitutivos são superiores para fins de identificação, uma vez que as sequências genéticas de rRNA mais conservadas nem sempre permite a discriminação de espécies (MARTENS et al., 2008).

Com base em estudos de diversidade bacteriana, limites de similaridade 94-96%, foram propostos como padrão para delineamento de espécies, porém esses valores podem ser diferenciados dependendo da espécie (RICHTER et al., 2015). O valor de similaridade de

97,3% foi proposto como ponto de corte para o delineamento de espécies de *Sinorhizobium* (MARTENS et al., 2008).

No presente trabalho, os valores de similaridade das bactérias com base no sequenciamento do gene *gyrB* foram abaixo de 97,86% com relação a estirpe tipo *S. alkalisoli* YIC4027<sup>T</sup>, com exceção da bactéria G10 a qual foi de 100% com *S. teranga*.

Estudos de Tampakaki et al. (2017) também foram observados valores de similaridade baixos (92,1-93,5%), baseados em seis genes constitutivos, dentre eles o *gyrB*, com os isolados de *Sinorhizobium* e *S. fredii* USDA257 com a estirpe tipo *S. fredii* USDA205.

Com base nos valores de similaridade obtidos por meio da análise do gene *gyrB* é importante destacar que, com exceção da bactéria G10, todos os demais isolados apresentaram baixa similaridade filogenética com as bactérias de referência depositadas no banco de dados GenBank (NCBI). Essa baixa similaridade pode indicar a possibilidade de novas espécies, entretanto é necessário o sequenciamento de outros genes constitutivos que venham confirmar essa hipótese.

Foram observadas incongruências entre as filogenias de genes simbióticos e do gene constitutivo *gyrB*. Enquanto que na filogenia do gene *gyrB* a maioria das bactérias agruparam-se com *S. alkalisoli* e uma com *S. teranga*, nos genes *nodC* e *nifH* as bactérias ficaram próximas a *S. americanum*. Este fato pode estar relacionado com a transferência horizontal de genes simbióticos.

A filogenia de genes simbióticos, baseadas nos genes *nodC*, *nifH* e *rhcRST*, quando comparadas com a filogenia de genes constitutivos, mostraram que estirpes de *Sinorhizobium* isolados de feijão caupi divergiram acentuadamente das estirpes-tipo e de referência *S. fredii* (TAMPAKAKI et al., 2017).

Estudos realizados por Barcellos et al. (2007) identificou que uma estirpe nativa de *S. fredii* (CPAC 402) recebeu toda a ilha simbiótica da estirpe inoculante de *B. japonicum* e manteve uma cópia extra do gene *nifH* original. As sequências de nucleotídeos *nodC* dessa mesma estirpe também eram idênticas às das estirpes de *B. japonicum*, indicando que ela foi adquirida por meio da transferência horizontal de genes.

Zuber et al., (2023) por meio do sequenciamento do 16S rRNA demonstraram em seus estudos microssimbiontes pertencentes ao gênero *Sinorhizobium*, com genomas sequenciados relacionados a *S. mexicanum*, *S. chiapanecum* e *S. psoraleae* dominantes em nódulos radiculares de *Desmanthus virgatus*. Após análises de marcadores *nodA* e *nodC* os resultados indicaram que, em alguns dos isolados, a transferência horizontal de genes pareceu ser

responsável pela falta de congruência entre as filogenias do cromossomo e da região simbiótica.

As filogenias *nodC* e *nifH* em uma coleção de 83 cepas de rizóbios, a maioria originada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, foram geralmente semelhantes, mas foram detectados casos de incongruência, sugerindo que rearranjos genéticos ocorreram no curso da evolução. Os resultados apoiam a visão de que a transferência horizontal de genes entre espécies de rizóbios e, em alguns casos, entre os gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* desempenha um papel na diversificação e na estruturação das populações naturais de rizóbios (LAGUERRE et al., 2001).

O primeiro experimento permitiu avaliar o crescimento, a nodulação e fixação de nitrogênio de gliricídia em condições de solo estéril em casa de vegetação. Não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos para as variáveis MSPA, MSR e Teor de N, contudo todos os tratamentos (inoculados e coinoculados) obtiveram valores superiores quando comparados com a testemunha absoluta.

Todos os tratamentos inoculados e coinoculados em condições de solo estéril obtiveram valores de número de nódulos similares as BR 8801 e 8802. Estirpes isoladas de nódulos radiculares de gliricídia e sombreiro, autenticadas em siratro, obtiveram valores de número de nódulos semelhantes às estirpes de referência (COELHO et al., 2018).

A massa seca dos nódulos apenas um tratamento coinoculado e oito inoculados foram significativamente superiores as BR 8801 e 8802. Existe uma correlação positiva entre a massa seca dos nódulos e o N total nas plantas, como consequência da inoculação com estirpes de rizóbios (DÖBEREINER, 1966).

No N total nenhum dos tratamentos obteve valores superiores ao tratamento com N mineral. Segundo Volpin e Kapulnik (1994), a resposta na acumulação de N em plantas duplamente inoculadas pode ser atribuída à nodulação antecipada, aumento do número de nódulos, maiores taxas de fixação de N e uma melhoria geral do desenvolvimento radicular. Neste estudo isso foi refletido em apenas oito tratamentos coinoculados, a maioria dos tratamentos inoculados foram melhores que as BR 8801 e 8802 e a testemunha absoluta.

O segundo experimento permitiu avaliar o crescimento, a nodulação e fixação de nitrogênio de gliricídia em condições de solo não estéril em viveiro. Todas as variáveis analisadas mostraram resultados significativos a 5% de probabilidade pelo teste de *Scott-Knott*.

Para a variável MSPA a maioria dos tratamentos inoculados e coinoculados apresentaram valores estatísticos similares aos da referencias BR 8801 e 8802, TA e TN.

Todas as bactérias testadas, incluindo a estirpe inoculante, BR 8802, apresentaram comportamento semelhante com relação às variáveis testadas. No entanto, observa-se que a inoculação contribuiu para o maior desenvolvimento da parte aérea quando comparado com o tratamento em que não foi adicionado N mineral, justificando a importância da inoculação (FLORENTINO et al., 2014).

A MSR os tratamentos inoculados T24, T25, T26, T27, T28, T29, T21, T32, T24 e BR 8801, e os tratamentos coinoculados T1, T2, T3, T16, T17, T18, T19, T20, T22 e T23 obtiveram valores superiores ao tratamento absoluto, com N mineral e BR8802. Foi observado aumento significativo no número de nódulos e na massa seca dos nódulos nas plantas inoculadas com *S. meliloti* e *Pseudomonas* spp. em comparação com plantas inoculadas unicamente com *S. meliloti* (GUIÑAZÚ et al., 2009). No presente estudo, a maioria dos tratamentos inoculados obteve massa seca de nódulos significativamente melhores que as coinoculações. As bactérias G10 e G18 foram significativas tanto sozinhas quanto coinoculadas com a BR 8801.

No número de nódulos, 11 dos 23 tratamentos coinoculados e oito dos 11 tratamentos inoculados apresentaram valores estatisticamente superiores a BR 8801 e 8802. Já para a variável massa seca dos nódulos somente o tratamento T16 que corresponde a coinoculação G28+8802 obteve resultado positivo superior ( $15,58 \text{ mg planta}^{-1}$ ) em relação aos tratamentos controles. Não ocorreu nodulação no tratamento nitrogenado o que confirma o efeito negativo no estímulo à nodulação na presença de N mineral, em resposta às exigências nutricionais da planta. De acordo com Moreira e Siqueira (2006) com o N mineral presente, a demanda reduz, não acontecendo o estímulo para a nodulação.

Com relação ao teor de nitrogênio nenhum dos tratamentos coinoculados e inoculados apresentou valores superiores ao tratamento nitrogenado, e alguns tratamentos foram similares à testemunha absoluta. Em estudos de Nascimento et al. (2021) todos os tratamentos inoculados e coinoculados resultaram em maior concentração de nitrogênio na parte aérea do feijão-caupi do que o controle negativo em condições de solo não estéril.

O valor mais expressivo de nitrogênio total (N total) foi para o tratamento coinoculado T2 com  $38,5 \text{ mg planta}^{-1}$ , este foi o único tratamento que estatisticamente ficou similar a testemunha nitrogenada. O teor de N das plantas de alfafa coinoculadas com *S. meliloti* e *Pseudomonas* spp. foi menor que o tratamento nitrogenado e das plantas inoculadas com a estirpe *S. meliloti* (GUIÑAZÚ et al., 2009).

Com relação à eficiência nodular os tratamentos coinoculados T1, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22 e T23, e o tratamento inoculado T32 apresentaram resultados estatísticos

inferiores comparados à testemunha absoluta e as BR 8801 e 8802, todos os outros tratamentos obtiveram valores estatísticos similares a BR 8801 e 8802.

Os tratamentos que mais se destacaram com relação às variáveis analisadas em ambos os experimentos foram: tratamentos inoculados (G10, G19, G28, G30, G36, G44 e G49), tratamentos coinoculados com a BR 8801 (G10, G18, G30, G44 e G49) e tratamentos coinoculados com a BR 8802 (G10, G28 e G51).

Na análise conjunta dos tratamentos de inoculação e coinoculação do experimento de eficiência simbiótica em condições de solo estéril, de modo geral as bactérias G10 e G19 foram significativamente diferentes e estiveram presente em quase todos os parâmetros analisados, com exceção da bactéria G10 para o parâmetro número de nódulos (NN) e a bactéria G19 para massa seca da raiz (MSR).

Além disso, todas as coinoculações da bactéria G10 com as BR 8801 e 8802 diferiram significativamente do tratamento controle, o que indica que a mistura desse microorganismos com as estirpes de referencia produzem um efeito sinérgico e consequentemente influenciam no crescimento e desenvolvimento da gliricídia.

A inoculação G30 não teve diferenças estatísticas significativas com relação ao tratamento controle em nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, sua coinoculação seja com a BR 8801 ou com a BR 8802 produziu efeitos significativos em todos os parâmetros analisados.

Com relação às coinoculações com a BR 8801, estas produziram efeitos significativos em todas as variáveis em estudo, principalmente nas variáveis MSPA, MSN, N total e Eficiência nodular.

As coinoculações com a BR 8802 foram menos expressivas quando comparadas com as coinoculações com a BR 8801, no entanto houve diferenças estatísticas com as coinoculações em todos os parâmetros estudados.

O parâmetro MSR foi o que apresentou os menores índices de inoculações e coinoculações estatisticamente significativas em relação ao tratamento controle. Em geral, apenas quatro inoculações (G10, G36, G44 e G49), cinco coinoculações com a BR 8801 (G10, G30, G49, G51 e G52) e três coinoculações com a BR 8802 (G10, G18 e G36).

No experimento em condições de solo não estéril os valores de significância dos tratamentos inoculados e coinoculados são menos expressivos comparados com o experimento em condições de solo estéril, este fato se deve possivelmente pela presença de outros microorganismos do solo.

Dentre as inoculações as bactérias G10, G18, G28, G30 e G36 foram as únicas que diferiram significativamente do tratamento controle em pelo menos dois dos sete parâmetros analisados. Os parâmetros número de nódulos, N total e Eficiência nodular não apresentaram inoculações que fossem significativamente diferentes do controle.

Neste ensaio, diferentemente do experimento em solo estéril, as coinoculações com a BR 8802 foram mais significativas do que as coinoculações com a BR 8801. Com destaque para os parâmetros Teor de nitrogênio e Eficiência nodular.

De modo geral, os tratamentos coinoculados foram mais significativos em comparação com os tratamentos inoculados. Estes resultados corroboram com o que já foi evidenciado em outros trabalhos de coinoculação de dois rizóbios distintos (JESUS et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2021; LEITE et al., 2021).

Na análise de componentes principais, o PC1 e o PC2 explicaram 59,44% da variância no primeiro experimento e 58,38% para o segundo. O *Biplot* agrupou os tratamentos coinoculados parcialmente correlacionados aos tratamentos com inoculação única. O tratamento controle negativo foi posicionado à parte dos tratamentos de coinoculação e fertilização com N e parcialmente relacionado ao cluster de inoculação única. Técnicas analíticas multivariadas são pouco exploradas em experimentos de inoculação de rizóbios e experimentos de promoção de crescimento de plantas. Estas ferramentas deverão ajudar a indicar estratégias de inoculação e coinoculação para estudos futuros (VICARIO et al., 2016).

Este é o primeiro estudo desenvolvido em que se faz o uso da técnica de coinoculação com rizóbios do gênero *Sinorhizobium* isolados de solos do Semiárido brasileiro coinoculados com rizóbios do gênero *Rhizobium* autorizados para produção de inoculantes em *G. sepium*, no Brasil.

## 6. CONCLUSÃO

Os baixos valores de similaridade observados nas 10 estirpes isoladas (G18, G19, G28, G30, G36, G43, G44, G49, G51 e G51) com a estirpe tipo referência *S. alkalisoli* YIC4027<sup>T</sup> no sequenciamento do gene *gyrB*, pode indicar possíveis novas espécies de *Sinorhizobium*.

Os isolados de *Sinorhizobium* spp. apresentam potencial para promoção de crescimento de plantas de gliricídia. A coinoculação mostrou ser uma prática favorável, principalmente pela cooperação entre os isolados de *Sinorhizobium* spp. e as referências BR 8801 e 8802, com destaque para as bactérias G10, G19, G28, G44 e G49.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. E LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410. 1990.
- APOLINARIO, V. X., DUBEUX Jr., J. C., LIRA, M. A., FERREIRA, R. L., MELLO, A. C., SANTOS, M. V., SAMPAIO, E. V. S. B. and MUIR, J. P. Tree legumes provide marketable wood and add nitrogen in warm-climate silvopasture systems. **Agronomy Journal**, 107, 1915-1921. 2015
- ACOSTA-DURÁN, C., & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, 178(2), 161-164, 2002
- ARAÚJO, F. F. DE; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633–1643, 1999.
- ARORA, N. K.; EKTA K.; SACHIN S.; SAKSHI T. Phenetic, genetic diversity and symbiotic compatibility of rhizobial strains nodulating pigeon pea in Northern India, **Springer Nature**, 2018.
- BARCELLOS, F. G.B; MENNA, P.; BATISTA, J. S. da S.; HUNGRIA, M. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2635–2643. 2007.
- BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F. Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria do solo dos tabuleiros costeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:1287-1293, 2001
- BRASIL. Instrução Normativa no 13/2011 - Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, das especificações, garantias mínimas e tolerâncias dos produtos. 2011
- BALA, A., MURPHY, P., & GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, 12(4), 917-929, 2003
- BASTOS, R. A. **Co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal em feijoeiro comum**. 2016. 155f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.
- BÁRBARO, I. M. et al. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. Artigo em Hypertexto. Disponível em:< <http://www.infobibos.com/>. 2008

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. de. Bacteria/Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier. v. 1, p. 103-115, 2005.

CARVALHO RH de, JESUS EC, FAVERO VO et al. The co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* increases the early nodulation and development of common beans. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2020

CARVALHO FILHO, O.M.; DRUMOND, M.A. e LANGUIDEY, P.H. *Gliricidia sepium*. Leguminosa promissora para regiões semi-áridas. *Circular Técnica*, 35. Petrolina, EMBRAPA-CPATSA, 1997, p. 16.

CHAGAS JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A. e OLIVEIRA, A.N. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Revista Ceres*, vol. 56, n. 6, p. 812-817. 2009  
CORDOVILLA, D.P.M.; LIGERO, F. e LLUCH, C. Effect of salinity on growth, nodulation and Nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology*, vol. 11, n. 1, p. 1-7. 1999

COELHO, K.P.; RIBEIRO, P.R.D.A.; MOURA, E.G.D.; AGUIAR, A.D.C.F.; RODRIGUES, T.L.; MOREIRA, F.M.D.S. Symbiosis of rhizobia with *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* in an Oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão State. **Acta Sci. Agron**. 2018, 40, e35248.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 38, 392–397. 1988

CASIDA, L. E., Jr. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. **Int J Syst Bacteriol** 32, 339–345. 1982

COSTA, E. M. et al. Growth and yield of the cowpea cultivar BRS Guariba inoculated with rhizobia strains in southwest Piauí. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3073–3084, 2014.

CHUIRE, L. M., BANGEL, E. V., MOSTASSO, F. L., CAMPO, R. J., PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbios recomendadas para as 3 culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 27(5): 8833 839, 2003.

DÖBEREINER J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight [29]. **Nature** 210:850–852, 1966

DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, M.D., DREYFUS, B., KERSTERS, K. & GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44, 715–733, 1994

DAKORA, F.D; KEYA, S.O. Nitrogen fixation in sustainable agriculture: the African experience. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.809-818, 1997.

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

FLORENTINO, L. A., REZENDE, A. V., MESQUITA, A.C., LIMA, A. R., MARQUES, D. J., & MIRANDA, J. M. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, 37(3), 320-338, 2014

FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.] **Tese** (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 320–338, 2014

GAUNT, M.W.; TURNER, S.L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S.A.; YOUNG, J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 2037-2048, 2001.

GEVERS D., COHAN F.M., LAWRENCE J.G., SPRATT B.G., COENYE T., FEIL E.J., STACKEBRANDT E., VAN DE PEER Y., VANDAMME P., THOMPSON F.L., SWINGS J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.

GLAESER, S. P. G.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**. 237–245. 2015.

GUIÑAZÚ, L.B; ANDRÉS, J.A.; PAPA, M. F. Del; PISTORIO, M.; ROSAS, S. B. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. **Biol Fert Soil** 46:185–190, 2009

GÓMEZ, M.E., RODRIGUEZ, L., MURGUEITIO, E., RIOS, CL.I., MÉNDEZ, M., MOLINA, C.H., MOLINA, C.H., MOLINA, E., MOLINA, J.P. Árboles y Arbustos Forrajeros Utilizados en Alimentación Animal Como Fuente Proteica. 3.ed. Cali, Colombia., p.1-147, 2002

HUNGRIA M, NOGUEIRA MA, ARAUJO RS. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **Am J Plant Sci** 6:811–817, 2015

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol Fert. Soils** 49, 791–801, 2013

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, S. R. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M. (eds.). *Biologia dos solos dos Cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.189-294. 1997

HERRIDGE, D.F. "Inoculation technology for legumes," in *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*, eds M.J. Dilworth, E.K. James, J. Sprent I, and W.E. Newton (Dordrecht: Springer), 77–115. 2008

JESUS. E. de C, et al. Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. *Plant Soil* 425:201–215, 2018

KONSTANTINIDIS K.T., TIEDJE J.M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.504-509, 2007.

KUZMANOVIĆ, N., FAGORZI, C., MENGONI, A., LASSALLE, F., and di Cenzo, G.C. "Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 72(3):005243. 2022.

KONSTANTINIDIS, K. T., RAMETTE, A., TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7286–7293, 2006.

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**. 147, 981–993. 2001

LEITE, R. de A. et al. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. **Applied Soil Ecology**. 172 104356. 2022

LI, Y., YAN, J., YU, B., WANG, E.T., LI, X., YAN, H., LIU, W., and XIE, Z. "Ensifer alkanisoli sp. nov. isolated from root nodules of *Sesbania cannabina* grown in saline-alkaline soils." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 66:5294-5300. 2016.

LLORET, L., ORMENO-ORRILLO, E., RINCON, R., MARTINEZ-ROMERO, J., ROGEL-HERNANDEZ, M.A., and MARTINEZ-ROMERO, E. "*Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico." **Syst. Appl. Microbiol.** 30:280-290. 2007

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. **Editora UFLA**, p. 407–447, 2006

MARTINS LMV, XAVIER GR, RANGEL FW et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biol Fertil Soils* 38:333–339, 2003

MARINHO RCN, FERREIRA LDVM, da SILVA AF et al. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. *Bragantia* 71:273–281, 2017

MOREIRA, F.M.S. e SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras, UFLA, 729 p., 2006

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A. B.; FEIL, E; MORELLI, G.; RUSSELL, J.E.;

- URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.95, p.140–3145, 1998.
- MARTENS M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 489-503, 2007.
- MARTENS M, DAWYNDT P, COOPMAN R, GILLIS M, DE VOS P AND WILLEMS A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **Int J Syst Evol Microbiol** 58:200-214. 2008.
- MAIDEN, M.C. Multilocus sequence typing of bacteria Annu. **Rev. Micro-biol.** 60, 561–588. 2006.
- MARIN, A. M. P.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, E. D.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Efeito da *Gliricidia sepium* sobre nutrientes do solo, microclima e produtividade do milho em sistema agroflorestal no agreste paraibano. **R. Bras. Ci. Solo**, 30:555-564, 2006
- M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, n. 5, p. 301-320, 1997.
- MOURA NETO, L. de. Eficiência simbiótica de rizóbios em feijão guandu em casa de vegetação. **Dissertação** (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Agricultura do Trópico Úmido) INPA, Manaus, 2020.
- NASCIMENTO T. R. do et al. Co-inoculation of two symbiotically efficient *Bradyrhizobium* strains improves cowpea development better than a single bacterium application. **3 Biotech** ISSN 2190-572X v. 11 n. 1. 2021.
- NORRIS, D.O., T MANNETJE, L. The symbiotic specialization of african *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **E. Afr. Agr. For. J.** 29 (3), 214–235, 1964
- PAULINO G. L; ALVES, B. J. R; BARROSO, D.G.; URQUIADA, S; ESPINDOLA, J. A. A. Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e gravioleira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.12, p.1598-1607, dez. 2009
- PERRET X, STAEHELIN C, BROUGHTON WJ, Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol Mol Biol** 64:180–201. 2000
- PAULA, P. D. *et al.* Decomposição das podas das leguminosas arbóreas *Gliricidia sepium* e *Acacia angustissima* em um sistema agroflorestal. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 791-800, 2015
- PEREIRA JÚNIOR, L. R.; GAMA, J. S. N.; RESENDE, I. R. A. Propagação vegetativa de *Gliricidia sepium* no curimatáu paraibano. **Revista Verde** [S.I], v. 3, n. 3, p. 17-20, 2008

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

REMANS, R., RAMAEKERS, L., SCHELKENS, S., HERNANDEZ, G., GARCIA, A., REYES, J.L., MENDEZ, N., TOSCANO, V., MULLING, M., GALVEZ, L., VANDERLEYDEN, J. Effect of Rhizobium-Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting Phaseolus vulgaris L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant Soil** 312 (1–2), 25–37, 2008

RINCÓN-ROSALES R, LLORET L, Ponce E & MARTÍNEZ-ROMERO E. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. **FEMS Microbiol Ecol** 67: 103–117, 2019

RStudio Team, 2019. RStudio: integrated development for R. RStudio Inc, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>

ROME, S., M. P. FERNANDEZ, B. BRUNEL, P. NORMAND, and J.-C. CLEYET-MAREL. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46:972–980. 1996

RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R; RStudio: Boston, MA, USA, 2020

RINCÓN-ROSALES, R.; LLORET, L.; PONCE, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobia with Different Symbiotic Efficiencies Nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, Including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. Nov. Which Has Common Symbiotic Genes with *Sinorhizobium mexicanum*. **FEMS Microbiol. Ecol.** 67, 103–117. 2009

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

SCHOCH CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford), 2020

SANGINGA, N. Role of biological nitrogen fixation in legume-based cropping systems; a case study of West Africa farming systems. **Plant and Soil**, v.252, p.25-39, 2003

SAWADA H, SUZUKI F, MATSUDA I AND SAITOU N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. **J Mol Evol** 49:627- 644. 1999.

STACKEBRANDT E., FREDERIKSEN W., GARRITY G.M., GRIMONT P.A.D., KÄMPFER P., MAIDEN M.C.J., NESME X., ROSSELLÓ-MORA R., SWINGS J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043-1047, 2002.

STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro.

EMBRAPA-Agrobiologia, 2002

SARITA, S. et al. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 1, p. 1–11, set. de 2005.

SANTOS, J. W. M dos. Diversidade genética e potencial simbiótico de bactérias isoladas de guandu (*Cajanus cajan*) e gliricídia (*Gliricidia sepium*) em solos do Semiárido. Areia, 2022. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal da Paraíba

SÁ, N. M. H.; VARGAS, A. T. **Fixação biológica do nitrogênio por leguminosas forrageiras**. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Biologia dos Solos dos cerrados. 923–929, 1997.

TAMPAKAKI, A. P., FOTIADIS, C. T., NTATSI, G., & SAVVAS, D. A novel symbiovar (*aegeanense*) of the genus *Ensifer nodulates Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97(13), 4314–4325. 2017.

TOLEDO, I., LLORET, L. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Syst Appl Microbiol** 26, 54–64. 2003

TEIXEIRA PC, DONAGEMMA GK, FONTANA A, TEIXEIRA WG (eds). Manual de métodos de análise de solo, 3rd edn. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, 2017

THIAO, M., NEYRA, M., ISIDORE, E., & SYLLA, S. Diversity and effectiveness of rhizobial strains from *Gliricidia sepium* native to Reunion Island, Kenya and New Caledonia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20(7), 703-709, 2004

THIES JE, BOHLOOL BB, SINGLETON PW. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 1540–1545. 1991.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; AND KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729. 2013.

TURNER, S. L. & YOUNG, J. P. W. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Mol Biol Evol** 17, 309±319. 2000

VARGAS-DÍAZ, AA et al.. Isolation and evaluation of endophytic bacteria from root nodules of *Glycine max* L. (Merr.) and their potential use as biofertilizers. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 17, Issue 3, e1103, 2019

VICARIO JC, PRIMO ED, DARDANELLI MS, GIORDANO W. Promotion of peanut growth by co inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul** 35:413–419. 2016

WEISBURG, W. G.; BARNS, M. S.; PELLETIER, A.D.; LANE, J. D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WEI, G. H., WANG, E. T., TAN, Z. Y., ZHU, M. E. & CHEN, W. X. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. **Int J Syst Evol Microbiol** 52, 2231–2239. 2002

YOUNG, J.M., "The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a junior synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2002 legitimate? Request for an Opinion." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** (2003) 53:2107-2110. Published online 30 May 2003

YAN, H., YAN, J., SUI, X.H., WANG, E.T., CHEN, W.X. ZHANG, X.X., and CHEN, W.F. "*Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 66:2910-2916. 2016

ZUBER, N.E.; FORNASERO, L.V.; ERDOZAIN BAGOLÍN, S.A.; LOZANO, M.J.; SANJUÁN, J.; DEL PAPA, M.F.; LAGARES, A. Diversity, Genomics and Symbiotic Characteristics of Sinorhizobia That Nodulate *Desmanthus* spp. in Northwest Argentina. **Biology**. 12, 958. 2023.

ZAGO, L. F. et al. Inoculação de diferentes doses de *Bradyrhizobium* por cobertura e seu efeito na cultura da soja. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 21, n. 2, p. 65–69, 2018.

