

Isolamento e Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Obtidas de Diferentes Espécies de Estilosantes no Cerrado de Roraima

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Roraima
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 62

Isolamento e Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Obtidas de Diferentes Espécies de Estilosantes no Cerrado de Roraima

Krisle da Silva

Vicente Gianluppi

Oscar José Smiderle

Jerri Édson Zilli

Josimar da Silva Chaves

Alexandre Cardoso Baraúna

Cátia Aparecida Mosqueira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Roraima

Rodovia BR 174, Km 8 - Distrito Industrial

Caixa Postal 133 - CEP. 69.301-970

Boa Vista | RR

Fone/Fax: (95) 4009-7100

Fax: + 55 (95) 4009-7102

www.embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Roraima

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Aloísio Alcantra Vilarinho

Secretário-executivo: Hyanameyka Evangelista de Lima Primo

Membros: Antônio Carlos Centeno Cordeiro

Newton de Lucena Costa

Roberto Dantas de Medeiros

Maria Fernanda Berlingieri Durigan

Patricia da Costa

Karine Dias Batista

Jane Maria Franco e Oliveira

Supervisão editorial: Clarice Monteiro Rocha

Revisão de texto: Luiz Edwilson Frazão

Normalização bibliográfica: Jeana Garcia Beltrão Macieira

Editoração Eletrônica: Gabriela Beatriz de Lima

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)

Embrapa Roraima

Silva, Krisle da.

Isolamento e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio obtidas de diferentes espécies de estilosantes no cerrado de Roraima / Krisle da Silva, Vicente Gianluppi, Oscar José Smiderle, Jerri Édson Zilli, Josimar da Silva Chaves, Alexandre Cardoso Baraúna e Cátia Aparecida Mosqueira. - Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2017.

25 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 62).

1. Fertilidade do solo. 2. Fixação de nitrogênio. 3. *Stylosanthes*. I. Gianluppi, Vicente. II. Smiderle, Oscar José. III. Zilli, Jerri Édson. IV. Chaves, Josimar da Silva. V. Baraúna, Alexandre Cardoso. VI. Mosqueira, Cátia Aparecida. VII. Título.

CDD: 631.46

Autores

Krisle da Silva

Pesquisadora, Doutora em Microbiologia Agrícola,
Pesquisadora da Embrapa Roraima, Boa Vista, RR

Vicente Gianluppi

Mestre em Agronomia, Pesquisador da Embrapa
Roraima, Boa Vista, RR

Oscar José Smiderle

Doutor em Fitotecnia, Pesquisador da Embrapa Roraima,
Boa Vista, RR

Jerri Édson Zilli

Doutor em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa
Agrobiologia, Seropédica, RJ

Josimar da Silva Chaves

Doutorando em Agronomia, Professor do Instituto
Federal de Roraima, Campus Novo Paraíso, Caracará,
RR

Alexandre Cardoso Baraúna

Doutorando em Ciência do Solo; Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa Ciência do Solo,
Seropédica, RJ

Cátia Aparecida Mosqueira

Mestre em Agronomia pela Universidade Federal de
Roraima, Boa Vista, RR

Sumário

Introdução	07
Materiais e Métodos	08
Coletas e identificação de estilosantes no cerrado de Roraima	08
Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de estilosantes	09
Caracterização morfológica cultural	09
Autenticação das bactérias quanto à nodulação	09
Caracterização genotípica das bactérias	10
Resultados Obtidos	10
Coletas e identificação de estilosantes no cerrado de Roraima	10
Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de estilosantes	13
Caracterização morfológica dos isolados bacterianos	14
Autenticação da nodulação em plantas de feijão-caupi	15
Caracterização genotípica	15
Conclusões	19
Referências	20

Isolamento e Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Obtidas de Diferentes Espécies de Estilosantes no Cerrado de Roraima

Krisle da Silva

Vicente Gianluppi

Oscar José Smiderle

Jerri Édson Zilli

Josimar da Silva Chaves

Alexandre Cardoso Baraúna

Cátia Aparecida Mosqueira

Introdução

O cerrado de Roraima está localizado na porção central do estado e onde está inserida a Capital Boa Vista, estes solos estão na maioria em áreas planas ou com pequena declividade, com baixo teor de carbono devido à vegetação rala, com predominância de gramíneas que sofrem ação constante de incêndio associada a processo intenso de erosão laminar (MELO et al., 2003). São solos com pH ácidos, baixa fertilidade natural e com presença de alumínio. Além disso, o período de estiagem prolongado faz com que estes solos tenham que ser cuidadosamente manejados. Portanto, é necessária a busca por alternativas de manejos que possibilitem o estabelecimento da capacidade produtiva de pastagens nessa região.

Uma alternativa para a melhoria da fertilidade, em solos sob pastagens, é o consórcio de gramíneas com leguminosas forrageiras fixadoras de nitrogênio atmosférico, como por exemplo, as pertencentes ao gênero *Stylosanthes* (estilosantes). Este gênero compreende cerca de 50 espécies e subespécies nativas de áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África e as Américas, principalmente a América do Sul (QUECINI et al., 2002). Esta leguminosa possui capacidade de fixar altos níveis de nitrogênio em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, além de várias espécies serem tolerantes a solos ácidos e de baixa fertilidade (SCHULTZ-KRAFT; GIACOMETTI, 1978; CALLES; SCHULTZE-KRAFT, 2010a).

Apesar de sua ampla ocorrência, pouco se conhece sobre a diversidade de bactérias que fazem simbiose com esta leguminosa. Trabalhos feitos na Austrália relataram a predominância da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (DATE, 2010). No Brasil, atualmente são recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) duas estirpes bacterianas para a inoculação em *Stylosanthes* spp., BR 446 e BR 502, ambas do gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2011; DELAMUTA et al., 2016).

Nas savanas de Roraima, foram registradas sete espécies do gênero *Stylosanthes*: *S.*

capitata, *S. angustifolia*, *S. gracilis*, *S. viscosa*, *S. humilis*, *S. guianensis* e *S. scabra* (MEDEIROS; FLORES, 2014). No entanto, não há nenhuma informação sobre a diversidade das bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com estas leguminosas.

Assim, objetivou-se neste trabalho isolar e avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com estilosantes em áreas de savana em Roraima.

Material e Métodos

Coletas e identificação de estilosantes no cerrado de Roraima

As coletas foram realizadas no Campo Experimental Água Boa da Embrapa Roraima, localizado no Município de Boa Vista e também em fazendas produtoras de soja e arroz no Município de Bonfim (Tabela 1). As coletas foram realizadas no período chuvoso em Roraima, nos meses de julho e agosto de 2012.

A parte aérea das plantas de estilosantes contendo flores foi coletada para confecção de exsiccatas. Foram coletadas 10 plantas em cada ponto de coleta. Estas foram então depositadas no Herbário do Museu Integrado de Roraima (MIRR) para a identificação botânica de acordo com Medeiros e Flores (2014).

As raízes foram coletadas com auxílio de uma pá reta, a uma profundidade de 30 cm e distante 20 cm do coleto das plantas. Estas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos contendo papel úmido e levadas ao laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima, onde foram lavadas para observação de nodulação, coleta dos nódulos e isolamento.

Em cada ponto foram coletadas dez amostras de solo simples na profundidade de 0-20 cm, equidistantes 5m uma da outra, para formar uma amostra composta, para análises química e granulométrica (EMBRAPA, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Áreas de coleta de plantas de estilosantes no cerrado de Roraima.

Data	Ponto	Município/ Local	Descrição	Localização
01/08/2012	P1	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa Roraima	Área de integração-lavoura-pecuária floresta	N 02°39'49.8" W 060°50'55,8"
01/08/2012	P2	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa Roraima	Área de pastagem plantada	N 02°39'53,0" W 060°50'37,1"
01/08/2012	P3	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa Roraima	Capim nativo	N 02°40'10,7" W 060°50'55,8"
10/08/2012	P4	Bonfim/ Fazenda Prato Chique	Estrada próxima a lavoura de soja	N 03°17'20.5" W 060°20'45.6"
10/08/2012	P5	Bonfim/ Fazenda Prato Chique	Estrada próxima a lavoura de soja	N 03°17'32.8" W 060°21'26.7"
10/08/2012	P6	Bonfim/ Fazenda Tiaraju	Área de cultivo de arroz em pousio	N 03°16'03.8" W 060°16'18.5"

Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de estilosantes

Para o isolamento das bactérias, as raízes das plantas contendo nódulos recém-coletados foram lavadas para retirar o excesso de solo, seguido da retirada manual dos nódulos. Em seguida, foi realizada a desinfestação superficial destes nódulos com álcool 96% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos e 10 lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Os nódulos desinfestados foram individualmente macerados com pinça esterilizada e o extrato intranodular foi estriado utilizando alça de platina em placas de Petri contendo meio de cultura 79 (FRED; WASKMAN, 1928) com indicador vermelho congo (0,0025%) e incubadas a 28° C, avaliando-se o surgimento de colônias por 10 dias. As colônias resultantes foram cultivadas sucessivamente em meio de cultura 79 com indicador azul de bromotimol (0,5%) até à purificação.

Caracterização morfológica cultural

A caracterização foi iniciada a partir do crescimento de no mínimo três colônias isoladas, tendo sido avaliados o tempo de crescimento, alteração do pH do meio de cultura, forma e elevação das colônias, além da produção de muco (VINCENT, 1970). As estirpes foram inicialmente agrupadas pelo coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA, com o auxílio do programa NTSY (versão 2.1t). Nesta análise e também nas subsequentes foram incluídas as 45 estirpes que se encontravam estocadas na coleção de microrganismos da Embrapa Roraima.

A partir da caracterização morfológica cultural foram selecionados os isolados baseados nos grupos morfológicos, representatividade de cada local de coleta e espécies de estilosantes.

Autenticação das bactérias quanto à nodulação

A partir da caracterização morfológica cultural foram selecionados os isolados baseados nos grupos morfológicos, representatividade de cada local de coleta e espécies de estilosantes. Oitenta e nove isolados foram, então, avaliados quanto à capacidade de nodulação utilizando o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), cultivar BRS Guariba como hospedeiro, por ser uma cultura de ciclo curto e de ampla capacidade de nodulação com rizóbios de solos amazônicos (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012; SILVA et al., 2012) e, principalmente, pela falta de sementes viáveis da maioria das espécies de estilosantes.

Para este experimento foram utilizadas garrafas do tipo "longneck" (350 mL), contendo solução nutritiva esterilizada de Hoagland e Arnon (1950) modificada com ¼ de força (GUIMARÃES et al., 2012). As sementes de feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% (30 segundos), peróxido de hidrogênio 5% (5 minutos) e 10 lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Para a germinação, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo algodão e papel de germinação previamente esterilizados e umedecidos, e incubadas por 48 horas a 28 °C.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram à inoculação com os isolados selecionados das espécies de estilosantes, um controle positivo com a inoculação da estirpe BR 3262 (*Bradyrhizobium* sp.), recomendadas como inoculante para feijão-caupi e dois controles negativos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral). Os inoculantes foram preparados em meio, 79 líquido (5 dias; 28 °C), e 1 mL de inóculo foi aplicado a cada planta. No controle sem inoculação e com nitrogênio, utilizou-se a solução nutritiva completa, com 52,5 mg L⁻¹ de nitrogênio. Aos 20 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas para avaliação da nodulação.

Caracterização genotípica das bactérias

Todos os isolados autenticados como nodulantes em *V. unguiculata* foram crescidos em meio 79 líquido por quatro dias e o DNA genômico foi extraído utilizando o Kit RBC (número de catálogo: YGB 300) seguindo a recomendação do fabricante. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os iniciadores 27F e 1492R (LANE, 1991) e realizou-se o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA utilizando o iniciador 27F. O alinhamento, edição e análise filogenética foi realizada no programa Mega 6.06 (TAMURA et al., 2011), utilizando o método de agrupamento Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) e o modelo de distância Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). Para análise da árvore filogenética, foram incluídas as seguintes espécies tipo *Rhizobium japonicum* USDA 6^T (U69638), *Mesorhizobium loti* ATCC 700743^T (X67229), *Rhizobium leguminosarum* 3Hoq18^T (U29386), *Herbaspirillum seropedicae* Z67^T (Y10146) e *Burkholderia cepacia* Ballard 717^T (U96927).

Resultados Obtidos

Coletas e identificação de estilosantes no cerrado de Roraima

Foram identificadas cinco espécies do gênero *Stylosanthes*, três na cidade de Boa Vista no campo experimental Água Boa da Embrapa Roraima (*S. capitata*, *S. scabra* e *S. gracilis*) e duas na cidade de Bonfim em áreas de produtores (*S. humilis* e *S. angustifolia*) (Tabela 2). As cinco espécies de *Stylosanthes* identificadas neste trabalho já haviam tido sua ocorrência natural relatada nas savanas de Roraima, o qual representa um dos principais centros de origem deste gênero (MEDEIROS; FLORES, 2014). A ocorrência natural das espécies de estilosantes nestas áreas demonstra o seu potencial de adaptação em solos de baixa fertilidade e clima com ocorrência de período seco prolongado.

Tabela 2. Análise química e granulométrica das amostras de solo, identificação das espécies e números de isolados obtidos de plantas de estilosantes no cerrado de Roraima.

Tabela 2.

Ponto	pH H ₂ O	Características Químicas					Características Físicas				Espécies	Nº de bactérias isoladas
		Ca	Mg	K	Al	P	MO	Argila	Silte	Areia		
		cmolc dm ⁻³			mg dm ⁻³		%	g kg ⁻¹				
P1	5,4	0,32	0,10	0,03	0,25	4,42	1,08	173	16,5	810	<i>S. capitata</i> <i>S. scabra</i> <i>S. gracilis</i>	99
P2	4,8	0,26	0,16	0,03	0,40	3,13	-*	-	-	-	<i>S. capitata</i>	16
P3	4,1	0,3	0,2	0,01	0,80	3,00	1,10	200	40	760	<i>S. gracilis</i>	37
P4	6,8	0,81	0,24	0,14	0,01	11,54	2,61	124	68	808	<i>S. humilis</i>	32
P5	5,0	0,39	0,12	0,04	0,24	15,02	4,96	109	148	743	<i>S. angustifolia</i>	35
P6	5,4	0,24	0,07	0,10	0,17	22,84	9,72	111	127	762	<i>S. angustifolia</i>	39

*-não determinado

• *Stylosanthes capitata* Vogel

Esta espécie (Figura 1) foi coletada em dois pontos distintos no Campo Experimental da Embrapa Roraima (Tabela 2), no P1 em área próxima de experimento de integração lavoura pecuária floresta e no P2 em uma área de pastagem plantada. Trata-se de uma planta nativa do leste do Brasil e certas regiões da Venezuela. É perene, se desenvolve em solos com baixo valor de pH e baixa fertilidade e não cresce bem em solos férteis, além disso apresenta tolerância à antracnose (SCHULTZE-KRAFT; GIACOMETTI, 1978; GROF et al., 1979). Estas características tornam esta espécie (Figura 1) uma forrageira potencial para o uso em áreas de pastagens no cerrado de Roraima.



Figura 1. *Stylosanthes capitata* Vogel. Foto: Krisle da Silva e Josimar Chaves.

• *Stylosanthes scabra* Vogel

Esta espécie (Figura 2) foi coletada no P1 em área próxima a experimento de integração lavoura-pecuária-floresta. É amplamente distribuída no norte da América do Sul (Brasil,

Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Norte da Argentina) (EDYE; MAASS, 1997). Assim como *S. capitata* esta espécie se desenvolve em solos ácidos e de baixa fertilidade (SCHULTZE-KRAFT; GIACOMETTI, 1978).



Figura 2. *Stylosanthes scabra* Vogel. Foto: Krisle da Silva e Josimar Chaves.

- ***Stylosanthes gracilis* Kunth**

Esta espécie (Figura 3) foi coletada em duas áreas, uma no P1, próximo a experimento de integração lavoura-pecuária-floresta e no P3, uma área de cerrado nativo do Campo Experimental da Embrapa Roraima. *S. gracilis* ocorre exclusivamente em áreas abertas e secas, principalmente em savanas, em solos ácidos e mais arenosos. Trata-se de uma planta ereta, perene e adaptada ao fogo (CALLES; SCHULTZE-KRAFT, 2010b).



Figura 3. *Stylosanthes gracilis* Kunth. Foto: Krisle da Silva e Josimar Chaves.

- ***Stylosanthes humilis* Kunth**

Stylosanthes humilis (Figura 4) possui grande capacidade de se adaptar a solos inférteis e também possui a capacidade de responder à aplicação de nutrientes, principalmente fósforo (GATES; WILSON, 1974). Tem como origem a América Central e provavelmente a América do Sul e trata-se de uma planta anual ou bianual (ALCÂNTARA; BURFAH, 1992) e geralmente com crescimento prostrado (CALLES; SCHULTZE-KRAFT, 2010a).



Figura 4. *Stylosanthes humilis* Kunth. Foto: Josimar Chaves.

- ***Stylosanthes angustifolia* Vogel**

Esta espécie foi encontrada em duas propriedades particulares, P5 e P6, próximos a lavouras de soja e arroz, respectivamente (Tabela 2). Trata-se de uma planta perene, encontrada na Venezuela, Guiana, Suriname e Brasil (WILLIAMS et al., 1984). Trata-se de uma planta indicadora de solos ácidos e inférteis (SCHULTZE-KRAFT; GIACOMETTI, 1978).



Figura 5. *Stylosanthes angustifolia* Vogel. Foto: Josimar Chaves.

Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de estilosantes

Foram obtidos 504 nódulos de *Stylosanthes* spp. a partir de 60 plantas coletadas de seis áreas localizadas nos municípios de Boa Vista e Bonfim. Após o isolamento destes nódulos foram obtidas 258 bactérias, sendo 152 oriundas do município de Boa Vista, de áreas de integração lavoura-pecuária-floresta (P1), pastagem cultivada (P2) e de savana nativa (P3). Enquanto as demais 106 bactérias foram oriundas do município de Bonfim, as quais eram áreas próximas de lavoura de soja (P4 e P5) e arroz (P6) (Tabela 2). Em todas as plantas amostradas foi verificada a presença de nódulos que, no geral, se apresentaram bastante

abundantes. A diferença na proporção de isolados/nódulos pode ser reflexo do histórico de cultivo anterior de algumas áreas com soja e arroz, o que pode ter refletido em maior vigor vegetativo das plantas e, conseqüentemente, nódulos mais bem desenvolvidos e com bactérias mais ativas. Lopes et al. (2011) observou efeito positivo na nodulação em estilosantes mineirão com o aumento da dose de fósforo. É possível também que o estágio de desenvolvimento das plantas de ocorrência natural possa ter interferido no desenvolvimento dos nódulos, o que poderia explicar a maior recuperação de bactérias de nódulos da área P3.

Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

A caracterização morfológica dos 258 isolados bacterianos obtidos neste estudo e, mais 45 que se encontravam depositados na coleção de culturas, resultou no agrupamento dos isolados em seis grandes grupos (Tabela 3). Os grupos 1, 2 e 3 - representando mais de 70% das bactérias tiveram apenas isolados de crescimento rápido (até dois dias), enquanto os demais grupos representando aproximadamente 30% das bactérias tiveram bactérias que apresentaram crescimento lento em meio de cultura YMA (Tabela 3). Entre os grupos de bactérias de crescimento rápido observou-se que a maioria apresentou capacidade de acidificar o meio de cultura (grupos 1 e 2) e com colônias circulares, elevadas e com abundante produção de muco (grupo 1 e 3). Entre os grupos de crescimento lento prevaleceram bactérias que não alteraram o pH do meio de cultura e que tiveram colônias circulares, elevadas e com pouca produção de muco.

Além disso, de forma geral, cada grupo morfológico foi formado por isolados oriundos de todas as espécies de *Stylosanthes* estudadas. A exceção foi o grupo 5, cujos isolados se originaram de apenas duas espécies de plantas, porém havendo apenas 8 isolados neste grupo (Tabela 3).

Tabela 3. Grupos morfológicos, número de isolados, características morfológicas, espécie de estilosantes de origem e número de isolados autenticados isolados de nódulos de *Stylosanthes* do Cerrado Roraima, Brasil.

GM	Nº de isolados no GM	Principais Características Morfológicas	Espécies originárias dos isolados	Nº de isolados autenticado/ testados
1	93	1 dia, pH ácido, colônias circulares e elevadas e muco moderado a abundante	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. capitata</i> , <i>S. scabra</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>S. humilis</i>	9/23
2	25	1 dia, pH ácido, colônias irregulares e planas e muco pouco a moderado	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. capitata</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>S. humilis</i> , <i>Stylosanthes sp.</i>	2/15
3	92	2 dias, pH neutro colônias circulares e elevadas e muco moderado a abundante	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. capitata</i> , <i>S. scabra</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>S. humilis</i> , <i>Stylosanthes sp.</i>	9/35
4	23	3 dias, pH neutro colônias irregulares e planas e muco pouco a moderado	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. capitata</i> , <i>S. scabra</i> , <i>S. humilis</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>Stylosanthes sp.</i>	5/5
5	8	3 dias, pH neutro colônias circulares e planas e muco pouco	<i>S. capitata</i> , <i>S. scabra</i> , <i>S. gracilis</i> ,	1/2

Continua.

Tabela 3. Continuação.

6	62	4 dias, pH neutro, colônias circulares e elevadas e muco pouco	<i>S. angustifolia</i> , <i>S. capitata</i> , <i>S. scabra</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>S. humilis</i>	5/9
Total	303	-	-	31/89

Autenticação da nodulação em plantas de feijão-caupi

Na autenticação confirmou-se que 31 isolados, menos de 50%, induziram a nodulação nas plantas, indicando serem então rizóbios (Tabela 3). Entre os grupos com bactérias de crescimento rápido esta proporção chegou a ser inferior a 15%, caso do grupo 3 (2/15), enquanto para os grupos com crescimento lento, a proporção chegou a 100% das bactérias testadas com habilidade de nodular, que foi o caso do grupo 4. Além disto, foram autenticados isolados oriundos de todas as espécies hospedeiras, exceto *S. humilis*.

Esta baixa quantidade de bactérias isoladas de nódulos e que foram hábeis em induzir nodulação em feijão-caupi, provavelmente seja reflexo da capacidade de diversos gêneros bacterianos se colonizarem endofiticamente nódulos de plantas leguminosas, mesmo não tendo a capacidade de induzir nodulação (KAN et al., 2007; LI et al., 2008; SHIRAISHI et al., 2010; MARRA et al., 2012; DA COSTA et al., 2013). De fato, existe hoje um crescente interesse no conhecimento da presença e no papel que desempenham bactérias colonizadoras de nódulos, mas que não estariam diretamente envolvidas na indução dos mesmos (MURESU et al., 2008; IBÁÑEZ et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; PEIX et al., 2015). Outro fato plausível é que sendo as plantas de *Stylosanthes* de hábito de crescimento bianual, ou às vezes até perene (LEWIS et al., 2005), poderia levar a planta a manter nódulos aparentemente ativos por vários meses, o que aumentaria o tempo de exposição dos mesmos à invasão de bactérias potencialmente endofíticas no ambiente.

Caracterização genotípica

Através da análise das sequências parciais do gene 16S rRNA dos 31 isolados comparados ao banco de dados do Genbank, através do sistema de busca BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) observou-se que os isolados se distribuíam nos seguintes gêneros: *Bradyrhizobium* (11 isolados), *Rhizobium* (11 isolados), *Burkholderia* (4 isolados), *Herbaspirillum* (4 isolados) e *Mesorhizobium* (1 isolado) (Tabela 4). Uma vez identificados estes gêneros, as sequências das espécies e o tipo de cada um deles (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia cepacia*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Mesorhizobium loti*) foram obtidas no GeneBank e utilizadas para a comparação com os isolados. Através da análise filogenética, os isolados foram agrupados com as cinco estirpes tipo representativas dos gêneros, sendo 23 isolados pertencentes à classe α -Proteobacteria e oito à β -Proteobacteria (Figura 6). Observou-se ainda em uma análise de identidade par a par que mesmo dentro de um determinado gênero, os isolados apresentaram similaridade entre eles bastante variável, chegando a diferença ser de até 8% em alguns casos e, também, em relação estirpe tipo das espécies bacterianas utilizadas (Figura 6, Tabela 4).

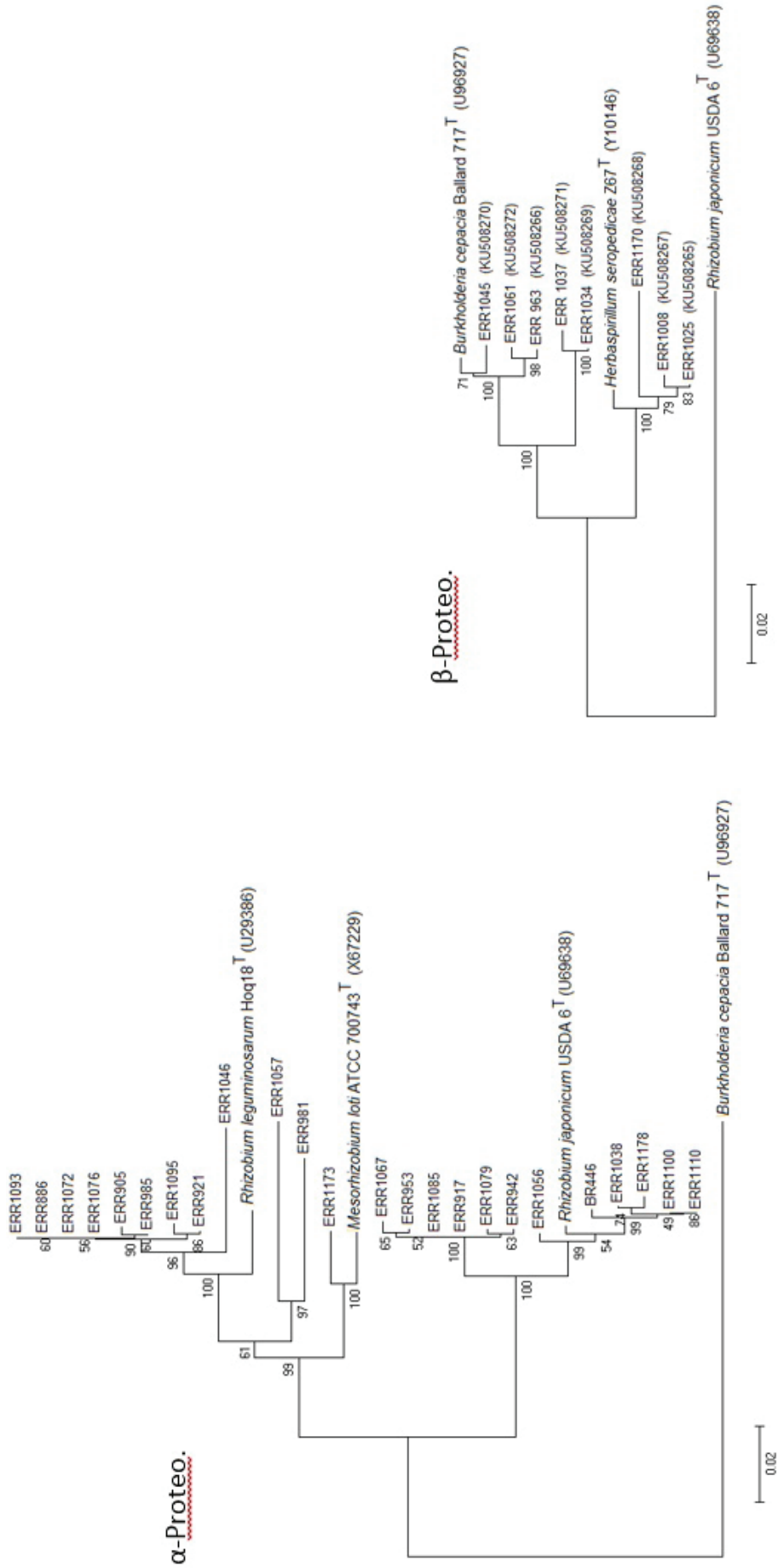


Figura 6. Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de nódulos de *Stylosanthes* e sequências de espécies tipo de diferentes gêneros. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining e parâmetro de Kimura 2 (K2P). Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. A barra indica 2 substituições a cada 100 nucleotídeos. α-Proteo. e β-Proteo. – α-Proteobacteria e β-Proteobacteria, respectivamente.

Tabela 4. Gêneros, grupos morfológicos, estirpes, similaridade, espécie hospedeira e locais de coleta de 31 isolados que nodularam em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) isolados de nódulos de *Stylosanthes* do Cerrado Roraima, Brasil.

Gênero	GM1	Estirpes	Sim. ² (%)	Espécie hospedeira	Local de origem
<i>Rhizobium</i>	1	ERR 886	97	<i>S. capitata</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	1	ERR 905	96	<i>S. capitata</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	1	ERR 921	96	<i>S. capitata</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	1	ERR 981	91	<i>S. angustifolia</i>	Faz. Tiajura - Bonfim
	1	ERR 985	91	<i>S. angustifolia</i>	Faz. Tiajura - Bonfim
	1	ERR 1071	97	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	3	ERR 1046	97	<i>S. capitata</i>	CEAB/Boa Vista
	3	ERR 1057	90	<i>S. capitata</i>	CEAB/Boa Vista
	3	ERR 1093	97	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	3	ERR 1095	96	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
<i>Mesorhizobium</i>	3	ERR 1072	98	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	3	ERR 1173	97	<i>Stylosanthes sp.</i>	CEAB/Boa Vista
<i>Herbaspirillum</i>	1	ERR 1025	99	<i>S. angustifolia</i>	Faz. Tiajura - Bonfim
	2	ERR 1021	91	<i>S. angustifolia</i>	Faz. Tiajura - Bonfim
	3	ERR 1008	99	<i>S. angustifolia</i>	Faz. Tiajura - Bonfim
	3	ERR 1170	93	<i>Stylosanthes sp.</i>	CEAB/Boa Vista
<i>Burkholderia</i>	1	ERR 1034	93	<i>S. gracilis</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	1	ERR 1045	99	<i>S. capitata</i>	CEAB/Boa Vista
	2	ERR 1037	93	<i>S. gracilis</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	5	ERR 1061	98	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
<i>Bradyrhizobium</i>		ERR 953	96	<i>Stylosanthes sp.</i>	CEAB/Boa Vista
		ERR 917	97	<i>S. capitata</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	4	ERR 942	96	<i>Stylosanthes sp.</i>	CEAB/Boa Vista
		ERR 1038	99	<i>S. gracilis</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
		ERR 1067	96	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
		ERR 1178	98	<i>Stylosanthes sp.</i>	CEAB/Boa Vista
		ERR 1110	99	<i>S. gracilis</i>	CEAB/Boa Vista
		ERR 1056	99	<i>S. capitata</i>	CEAB/Boa Vista
	6	ERR 1079	96	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
		ERR 1085	97	<i>S. scabra</i>	CEAB-ILPF/Boa Vista
	ERR 1100	99	<i>S. gracilis</i>	CEAB/Boa Vista	

Quatro dos grupos morfológicos (1-4) englobaram isolados, cuja análise do gene 16S rRNA apontou diferentes gêneros (Tabela 4), exceto os grupos 4 e 6 nos quais todas as bactérias foram agrupadas no gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 4). Correlacionando-se a espécie hospedeira original e os gêneros de rizóbios obtidos, observou-se que os isolados obtidos de *S. angustifolia* são pertencentes ao gênero *Rhizobium* e notadamente *Herbaspirillum* (3 dos 4 isolados autenticados); de *S. capitata* e *S. scabra* *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*; de *S. gracilis* *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*; enquanto de *Stylosanthes* sp. foram obtidos *Herbaspirillum*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Tabela 4). Não foram observadas diferenças importantes na distribuição dos gêneros bacterianos nos diferentes locais e pontos de coleta (Tabela 4).

α -Proteobactéria compreendem os tradicionais gêneros de bactérias nodulantes como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre outros (PEIX et al., 2015). Por outro lado, β -Proteobactérias foram confirmadas como nodulantes apenas recentemente (MOULIN et al., 2001; LU et al., 2012; BOURNAUD et al., 2013; DE MEYER et al., 2014) e a grande maioria das espécies isoladas, principalmente no Brasil, foram obtidas da subfamília Mimosoidea e apenas alguns relatos para Papilionoideae (PEIX et al., 2015; GARAU et al., 2009; SILVA et al., 2012). Como o *Stylosanthes* é um gênero da subfamília Papilionoideae, a obtenção de β -Proteobactéria nodulantes representa uma nova informação, visto que na literatura há apenas relatos com *Bradyrhizobium* (α -Proteobactéria). Ainda dentro da β -Proteobactérias nodulantes, vários estudos têm sido feitos com o gênero *Burkholderia* (GILLIS et al., 1995; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; MOREIRA et al., 2002; REIS et al., 2004; VANDAMME et al., 2002; LI et al., 2008) e poucos para outras espécies como *Cupriavidus* e *Herbaspirillum* (LIU et al., 2011; SILVA et al., 2012; BALDANI et al., 1986; CARRO et al., 2012). Neste trabalho foram encontrados 4 isolados de *Herbaspirillum*, sendo 3 da espécie *S. angustifolia*, o que corrobora algumas poucas observações anteriores da capacidade de nodulação deste gênero (VALVERDE et al., 2003; PEIX et al., 2015).

A especificidade das β -Proteobactéria em Mimosoidea mostra que seria razoável considerar a possibilidade de especificidade hospedeira também de algumas espécies de *Stylosanthes* com alguns grupos de rizóbios, o que poderia ter restringido a nodulação das plantas de feijão-caupi e, portanto, a autenticação das mesmas como nodulantes. A especificidade de resposta à inoculação já foi observada entre espécies de *Stylosanthes* e *Bradyrhizobium* e às condições ambientais como estiagem e pH do solo seriam determinantes para a ocorrência desta especificidade (DATE, 2010; DATE; EAGLE, 2010). Apesar disto ser possível e explicaria o fato de nenhuma bactéria isolada de *S. humilis* ter sido autenticada como nodulante, para os isolados oriundos das outras espécies de estilosantes autenticados tenderam a se distribuir entre as várias espécies hospedeiras exceto aquelas identificadas como *Herbaspirillum* (Tabela 4), o que mostra que testes específicos serão necessários para confirmar ou não a especificidade.

A maioria dos isolados autenticados que representa os grandes grupos morfológicos pertence ao gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (α -Proteobactéria). Contudo, apesar de haver alta diversidade de espécies dentro do gênero *Stylosanthes*, da sua ampla distribuição geográfica e da importância como forragem, muito pouco se conhece sobre as bactérias em simbiose com esta leguminosa. Como ocorre com diversas outras espécies de leguminosas herbáceas tropicais, o *Stylosanthes* predominantemente estabelece simbiose com espécies de *Bradyrhizobium*, como é o caso da estirpe BR 446 recomendada para a cultura (BRASIL, 2011). Neste estudo, entretanto, a proporção de *Bradyrhizobium* em

relação a outras espécies foi de 30% (10 das 31 bactérias autenticadas e a proporção de bactérias de crescimento lento e rápido através da caracterização morfológica também manteve esta proporção), confirmando a ausência de informações sobre a extensão da diversidade de bactérias fixadora de nitrogênio em simbiose com *Stylosanthes*.

Conclusões

Há uma elevada diversidade de bactérias associadas a diferentes espécies de *Stylosanthes* spp. no cerrado de Roraima.

Existem ao menos 5 gêneros bacterianos capazes de nodular *Stylosanthes* spp.

Tanto α -Proteobacteria quanto β -Proteobacteria são capazes de nodular *Stylosanthes* spp.

Referências

- ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas & leguminosas**. São Paulo, SP: Nobel, 1992. 162p.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, p.86-93. 1986.
- BOURNAUD, C.; de FARIA, S. M.; SANTOS, J. M.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). **PLoSOne**, v.8, n.15, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura**. Brasília: MAPA, 2011.
- CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. Re-establishment of *Stylosanthes gracilis* (Leguminosae) at species level. **Kew Bulletin**, v. 65, p.233–240, 2010b.
- CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. *Stylosanthes* (Leguminosae, Dalbergieae) of Venezuela. **Willdenowia**, v.40, p.305-329, 2010a.
- CARRO, L.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M.; GONZÁLEZ-TIRANTE, M.; VELÁZQUEZ, E.; VALVERDE, A.; *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.62, p.1300-1306, 2012.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão-caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.32, n.1, p.161-169, 2010.
- COSTA, E. M. da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.9. p.1275-1284, set., 2013. DOI:10.1590/S0100-204X2013000900012.
- DATE, R. A. *Bradyrhizobium* effectiveness response in *Stylosanthes hamate* and *S. seabrana*. **Tropical Grasslands**, v.44, p.141-157, 2010.
- DATE, R. A.; EAGLES, D. A. *Bradyrhizobium* strain effectiveness for *Stylosanthes macrocephala*. **Tropical Grasslands**, v.44, p.158–164. 2010.
- DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ARAÚJO, J. L. S.; ROUWS, L. F. M.; ZILLI, J. E.; PARMA, M. M.; MELO, I. S.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.3078-3087, 2016. Doi: 10.1099/ijse.0.001148.
- DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; MAKER, G.; YATES, R.; HOWIESON, J. G.; VANDAMME, P. *Burkholderia sprengii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.3950-3957, 2014. DOI: 10.1099/ijse.0.048777-0.
- EDYE, L. A.; MAASS, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. I. The biogeography of *Stylosanthes hamate*, *S. scabra* and "*Stylosanthes seabrana*". **Tropical Grasslands**, v.31, p. 417-423, 1997.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212 p.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILIOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.2790-2798, 2001.

- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. Yeast extract-mannitol agar for laboratory. **Manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.
- GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biol. Biochem**, v.41, p.125-134, 2009.
- GATES, C. T.; WILSON, J. R. The interaction of nitrogen and phosphorus on the growth, nutrient status and nodulation of *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Townsville Stylo). **Plant and Soil**, v.41, p.325-333, 1974.
- GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P.; Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p.274-289, 1995.
- GROF, B.; SHULTZE-KRAFT, R.; MULLER, F. *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) **Tropical Grassland**, v. 13, p.28-37, 1979.
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A. SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.6726-6733, 2012.
- HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Califórnia Agriculture Experiment Station, 1950. (Circular. n°.347).
- IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 32, p.49-55, 2009.
- KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E.T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H; CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v.188, p.103-115, 2007.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In STACKEBRANDT, E, GOODFELLOW, M (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York, NY: John Wiley & Sons, 1991. p 115-175.
- LEWIS, G. L.; MACKINDER B.; LOCK, M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 2005.
- LI, J. H.; WANG, E. T.; CHENA, W. F.; CHENA, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.238-246, 2008. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.08.014.
- LIU, X. Y.; WU, W.; WANG, E. T.; ZHANG, B.; MACDERMOTT, J.; CHEN, W. X. Phylogenetic relationships and diversity of β -rhizobia associated with Mimosa species grown in Sishuangbanna, China. **Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.61, p.334-342, 2011.
- LOPES, J.; EVANGELISTA, A. R.; FORTES, C. A.; PINTO, J. C.; FURTINI NETO, A. E.; SOUZA, R. M. Nodulação e produção de raízes do estilosantes minerão sob efeito de calagem, silicatagem e doses de fósforo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.1, p.99-107, jan-fev., 2011.
- LU, J. K.; HE, X. H.; HUANG, L. B.; KANG, L. H.; XU, D. P. Two *Burkholderia* strains from nodules of *Dalbergia odorifera* T. Chen in Hainan Island, Southern China. **New Forests**, v.43, p. 397-409, 2012.
- MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M. de; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J. M. de; MOREIRA, F. M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.
- MEDEIROS, E. C. S.; FLORES, A. S. O gênero *Stylosanthes* (Leguminosae) em Roraima, Brasil. **Rodriguésia**, v.65, n.1, p. 235-244, 2014.
- MELO, V. F.; GIANLUPPI, D.; UCHOA, S. C. P. **Características edafológicas dos solos do estado de Roraima**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2003. 28p. (Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento,01).

- MOREIRA, F. M. S.; TIEDJE, J.; MARSH, T. L. *Burkholderia* spp. Are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazonia and from Brazilian leguminosae forest species. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA, 21., CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, 6., 2002, Cocoyoc. **Memorias...** México: FAO, 2002. v.1, p.45-46.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C.; Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p.948-950, 2001.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.63, 383-400, 2008.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.34, n.1-3, p.17-42, 2015.
- QUECINI, V. M.; OLIVEIRA, C. A.; ALVES, A. C.; VIEIRA, M. L. C. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.73-80, 2002.
- REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant associated bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.54, p.2155-2162, 2004.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.
- SCHULTZE-KRAFT, R.; GIACOMETTI, D. C. Genetic resources of forage legumes for the acid, infertile savannas of tropical America. In: SÁNCHEZ, P. A.; TERGAS, L. E. (Ed.). **Pasture production in acid soils of the tropics: proceedings of a seminar held at CIAT, Cali, Colombia.** Cali, Colombia: CIAT, 1978. p. 55-64.
- SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteo bacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.269-274, 2010. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.04.005.
- SILVA, F. V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; SILVA JÚNIOR, J. P.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Genetic diversity of rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.682-691, 2012. DOI:10.1590/S517-83822012000200033.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA6.06: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011. DOI:10.1093/molbev/msr121.
- VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, p.1979-1983, 2003.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A.. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 507-512, 2002.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodulate bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p.
- WILLIAMS, R. J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; SOUSA COSTA, N. M.; THOMAS, B. D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **The Biology and Agronomy of Stylosanthes.** Australia: Academic Press, 1984. p. 73-101.

Embrapa

Roraima

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

