

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**ALEKSANDRO FERREIRA DA SILVA**

**POPULAÇÕES DE ALFA E BETA-RIZÓBIOS DE FEIJÃO-CAUPI  
NATURALMENTE ESTABELECIDAS EM SOLOS DO SEMIÁRIDO  
TROPICAL**

**Recife  
2019**



Aleksandro Ferreira da Silva

Engenheiro agrônomo

**Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo

Orientadora

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientadores

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra

**Recife  
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

S586p Silva, Aleksandro Ferreira da  
Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical / Aleksandro Ferreira da Silva. – 2019.  
123 f. : il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.

Coorientadores: Paulo Ivan Fernandes Júnior e Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Nitrogênio – Fixação 2. Leguminosa 3. Simbiose 4. Vigna unguiculata 5. Caatinga I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orient. II. Fernandes Júnior, Paulo Ivan, coorient. III. Lyra, Maria do Carmo Catanho Pereira de, coorient. IV. Título

CDD 631.4

ALEKSANDRO FERREIRA DA SILVA

**Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019

---

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Lindete Míria Vieira Martins  
Universidade do Estado da Bahia

---

Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra  
Instituto Agronômico de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jakson Leite  
Universidade Federal de Alagoas

---

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Júnior  
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Aos meus pais (Floraci Ferreira e Izidorio Anacleto), irmãos (Fábio Ferreira e Douglas Ferreira) e minha amada namorada (Kelly Alexandra), por me ensinarem o valor do verdadeiro amor.

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por tudo que tenho conseguido e por ter me lapidado a cada manhã, proporcionando inconformismo construtivo, mantendo os meus pés no chão e também por não ter me deixado fugir nenhuma vez do caminho por mim escolhido.

Aos meus pais (Floraci Ferreira da Silva e Izidorio Anacleto da Silva) e irmãos (Fábio Ferreira da Silva e Douglas Ferreira da Silva), por toda educação, amor, carinho, respeito e apoio durante toda minha vida.

A minha namorada, Kelly Alessandra Souza Menezes, por sempre acreditar em mim, pela paciência, amor, companheirismo e exemplo de ser humano. Te amarei eternamente.

A minha orientadora, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas pela orientação, amizade, apoio, incentivo, paciência e principalmente pelo exemplo de pessoa que é. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos.

Aos co-orientadores, Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior e Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra, pelas contribuições. A Dr. Paulo agradeço também por todas as oportunidades desde a graduação e valiosas contribuições nessa reta final.

A professora Lindete Míria Vieira Martins por ter feito parte da minha vida acadêmica desde o início. Agradeço pela confiança, ensinamentos, conselhos, e por ser uma pessoa incrível.

Aos bolsistas Andressa e Pablo pela amizade e suporte em várias etapas do trabalho, serei sempre grato.

Aos amigos que fizeram parte da realização desse sonho: Vinícius Gomes, Juscélia Ferreira, Mayame Brito, Adriana Bezerra, Juliet Emília, Emanuelle Maria e Cícero Abraão.

Ao Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio – GFBN da UFRPE: Augusto Cesar, Sueide Karina, Jéssica Rafaella, Leandro Reis, Layane Barbosa e Edilandia.

Aos amigos que fazem e fizeram parte do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido: Pamella Sena, Valéria Borges, Viviane, Claudia, Tailane, Thaise, Lucas e Reginaldo. Agradeço pela amizade, acolhimento e ensinamentos.

A professora Carolina Etienne pelo carinho e convivência desde o mestrado. Obrigado pela amizade e ensinamentos.

Ao amigo Jakson Leite por sempre se dispor a tirar minhas dúvidas inerentes ao trabalho. Agradeço pela oportunidade de ter me apresentado a professora Lindete e, conseqüentemente, por ter despertado em mim o interesse em fazer pesquisa. É um exemplo de profissional.

A professora Giselle Fracetto e ao professor Felipe Fracetto pela amizade, ensinamentos e confiança.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao PPGCS, pela oportunidade, acolhimento e condições concedidas para a realização do curso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pela parceria na realização da pesquisa, sob supervisão de Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

A Sra. Maria do Socorro Santana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela cordialidade e presteza.

Aos professores da banca examinadora, pela participação e valorosas sugestões atribuídas a este trabalho.

A todos os professores do PPGCS, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

**MUITO OBRIGADO**

## Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical

### RESUMO

Recentemente, importantes contribuições para o avanço do conhecimento da ecologia e diversidade de micro-organismos em diferentes ecossistemas brasileiros tem levado ao enriquecimento da taxonomia de rizóbios, inclusive com a descrição de novas espécies de microssimbiontes. A grande diversidade de condições edafoclimáticas (tipos de solo, precipitação média anual, etc.) e de características da vegetação da caatinga, tornam esse bioma um campo vasto para estudos de ecologia de rizóbios e para buscas de novas estirpes elites para recomendação como inoculantes. Objetivou-se com este trabalho, avaliar as características das populações de alfa e beta-rizóbios naturalmente estabelecidas em solos do Semiárido de Pernambuco cobertos com vegetação nativa. Para a realização de uma amostragem representativa das diferentes condições edafoclimáticas, foram selecionados pontos em áreas com cobertura de caatinga densa (com pouca interferência antrópica) e nas principais classes de solos ocorrentes no bioma: Argissolo, Neossolo Litólico, Neossolo Quartzarênico, Neossolo Regolítico, Latossolo, Luvisolo e Planossolo. As comunidades rizobianas nativas das amostras de solo coletadas foram acessadas em experimento em casa de vegetação utilizando o feijão-caupi como planta-isca. Essa espécie foi escolhida por sua conhecida habilidade de estabelecer simbiose com comunidades de alfa e beta-rizóbios. Dos nódulos coletados no experimento de planta-isca foram obtidos 434 isolados, dos quais 338 foram positivos para a amplificação do gene *nodC* (*nodC+*). Em sua maioria são isolados de crescimento rápido, com metabolismo que acidifica o meio de cultura e produtores de muito muco. Os 338 isolados foram submetidos à Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), para avaliar a variabilidade genética da coleção *nodC+*. A análise conjunta dos perfis de restrição do 16S rRNA, obtida a partir das endonucleases *HaeIII*, *MspI* e *Hin6I*, permitiu a formação de 209 grupos a 100 % de similaridade, evidenciando grande variabilidade genética entre os isolados. A partir do dendrograma do ARDRA, determinou-se um “threshold” de 75 % de similaridade e, a partir desse agrupamento, selecionou-se representantes dos grupos (um total de 60) para serem submetidos à amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Dos 60 isolados, selecionou-se, aleatoriamente, 30 para serem sequenciados os genes *nodC*, *recA* e *gyrB*. Levando em consideração o sequenciamento do 16S rRNA, *Paraburkholderia* (18) foi o gênero com maior número de isolados, seguido de *Rhizobium* (13) e *Bradyrhizobium* (10). Analisando a árvore com base nos 24 isolados com sequência de boa qualidade do gene *recA*, verificou-se que oito isolados fazem parte da classe das betaproteobactéria pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*. Para os alfa-rizóbios, apenas 2 isolados agruparam com o gênero *Rhizobium* e 12 ficaram agrupados com *Bradyrhizobium*. A maioria dos isolados agrupados com o gênero *Paraburkholderia* na árvore do gene *nodC* apresentaram alta similaridade com as estirpes referência. Por apresentarem sequências de *recA* e *gyrB* divergentes, na árvore concatenada, os isolados C88-4 e C59-4 formaram um grupo com baixa similaridade com as estirpes de referência de beta-rizóbios. Em alfa-rizóbios o comportamento foi semelhante. Este padrão de agrupamento demonstra a elevada variabilidade genética dos isolados e aponta para a existência de novos grupos taxonômicos dentre os isolados obtidos.

**Palavras-chave:** ARDRA. Fixação biológica de nitrogênio. Leguminosa. Simbiose. *Vigna unguiculata* (L) Walp.. Caatinga.



## Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical

### ABSTRACT

Recently, significant contributions to the advancement of the knowledge of the ecology and diversity of microorganisms in different Brazilian ecosystems have led to the enrichment of the taxonomy of rhizobia, including the description of new species of microsymbionts. The great diversity of soil and climatic conditions (soil types, mean annual precipitation, etc.) and characteristics of the vegetation of the caatinga make this biome a vast field for studies of rhizobia ecology and for the search of new elite strains for a recommendation as inoculants. The objective of this work was to determine the characteristics of naturally occurring alpha and beta-rhizobia populations in Pernambuco semi-arid soils covered with native vegetation. To perform a representative sampling of the different edaphoclimatic conditions, points were selected in areas with dense caatinga cover (with little anthropic interference) and in the main soil classes occurring in the biome: Ultisols, Leptosols, Arenosols, Regosols, Oxisols, Alfisols and Planosols. The native rhizobial communities of the collected soil samples were accessed in a greenhouse experiment using the cowpea as bait plant. This species was chosen for its known ability to establish symbiosis with alpha and beta-rhizobia communities. Of the nodules collected in the bait-plant experiment, 434 were obtained, of which 338 were positive for *nodC* (*nodC* +) gene amplification. Most are fast-growing isolates, with a metabolism that acidifies the culture medium and producers of much mucus. The 338 isolates were submitted to Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) to evaluate the genetic variability of the *nodC* + collection. The analysis of the restriction profiles of the 16S rRNA obtained from the endonucleases HaeIII, MspI and Hin6I, allowed the formation of 209 groups at 100 % of similarity, evidencing a high genetic variability among the isolates. From the dendrogram of the ARDRA, a threshold of 75 % of similarity was determined and, from this grouping, representatives of the groups (a total of 60) were selected to be submitted to the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. Of the 60 isolates, 30 were randomly selected to be sequenced the *nodC*, *recA* and *gyrB* genes. Taking into consideration the sequencing of 16S, Paraburkholderia (18) was the genus with the highest number of isolates, followed by Rhizobium (13) and Bradyrhizobium (10). Analyzing the tree based on 24 isolates with a good sequence of the *recA* gene, it was verified that eight isolates belong to the class of betaproteobacteria belonging to the genus Paraburkholderia. For the alpha-rhizobia, only 2 isolates grouped with the genus Rhizobium and 12 were grouped with Bradyrhizobium. Most of the isolates grouped with the genus Paraburkholderia in the *nodC* gene tree showed high similarity with the reference strains. Because of divergent *recA* and *gyrB* sequences in the concatenated tree, isolates C88-4 and C59-4 formed a group with low similarity to the reference strains of beta-rhizobia. In alpha-rhizobia the behavior was similar. This pattern of grouping demonstrates the high genetic variability of the isolates and points to the existence of new taxonomic groups among the isolates obtained.

**Keywords:** ARDRA. Biological nitrogen fixation. Leguminous. Symbiosis. *Vigna unguiculata* (L) Walp.. Caatinga.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Informações gerais dos municípios de coleta distribuídos nas zonas climáticas (ZC) do Agreste e Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil .....44
- Tabela 2 - Caracterização química de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil .....46
- Tabela 3 - Caracterização física e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil .....48
- Tabela 4 - Sítios de corte das enzimas utilizadas na Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) .....54
- Tabela 5 - Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para a proporção de alfa e beta-rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa na região Semiárida de Pernambuco .....68
- Tabela 6 - Identificação de 41 isolados bacterianos de feijão-caupi por meio da comparação de sequências do gene 16S rRNA com aquelas de estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank .....72
- Tabela 7 - Iniciadores que amplificaram o fragmento do gene *nodC*: A - Sarita et al. (2005); B - Elliot et al. (2007); Tempo de crescimento: R - rápido; L - lento, I - intermediário; reação de pH: A - ácido, N - neutro, Al - alcalino; tamanho da colônia (TC); cor da colônia (CC): A - amarela, C - creme; e quantidade de muco (QM): M - muito, P - pouco, dos 41 isolados que após o sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram sequências de boa qualidade .....73
- Tabela 8 - Produção de AIA, capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e produção de biofilme por rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa do Semiárido pernambucano .....87
- Tabela 9 - Uso de diferentes fontes de carbono por rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa do Semiárido pernambucano .....91



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fragmentos de caatinga densa localizados no Semiárido pernambucano .....41
- Figura 2 - Distribuição dos pontos de coleta no Semiárido de Pernambuco .....43
- Figura 3 - Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil .....50
- Figura 4 - Curva de calibração de AIA utilizada para quantificar, a partir da absorbância, o AIA produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....57
- Figura 5 - Reação colorimétrica da curva de calibração de AIA sintético utilizada para quantificar o AIA produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....58
- Figura 6 - Reação colorimétrica da curva de calibração de sideróforos utilizada para quantificar os sideróforos produzidos por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....59
- Figura 7 - Curva de calibração de sideróforos utilizada para quantificar, a partir da absorbância, os sideróforos produzidos por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....59
- Figura 8 - Produção de biofilme por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa. Adição de violeta de genciana (0,25 %) (A); Adição da solução álcool-acetona (proporção 80:20) (B); espectrofotômetro utilizado para estimar a formação de biofilme (C) .....62
- Figura 9 - Curva de calibração de biofilme utilizada para quantificar, a partir da absorbância, o biofilme produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....62
- Figura 10 - Amplificação do fragmento do gene simbiótico *nodC* em isolados de nódulos de feijão-caupi: C - fragmento amplificado utilizando os primers NodCfor540 e NodCrev1160 para alfa-rizóbios e, D - fragmento amplificado utilizando os primers NodCforBurk e NodCrevBurk para beta-rizóbios. Os números correspondem aos isolados selecionados aleatoriamente, e o B ao controle negativo. O marcador molecular (M) utilizado em C e D foi o de 100pb DNA ladder .....63
- Figura 11 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função do tempo de crescimento .....65

Figura 12 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da alteração do pH em meio de cultura .....	66
Figura 13 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da quantidade de muco (exopolissacarídeos) .....	66
Figura 14 - Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos do Semiárido de Pernambuco. Enzimas: HaeIII (A), Hin6I (B) e MspI (C) .....	67
Figura 15 - Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias parciais do gene 16S rRNA de 41 seqüências de bactérias isoladas de feijão-caupi e de 41 estirpes tipo utilizadas como referência (1152 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições .....	74
Figura 16 - Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias parciais do gene <i>recA</i> de 24 seqüências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências (315 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições .....	76
Figura 17 - Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias parciais do gene <i>gyrB</i> de 28 seqüências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 27 estirpes tipo utilizadas como referências (414 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições .....	78
Figura 18 - Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias parciais concatenadas dos genes <i>gyrB</i> + <i>recA</i> (729 pb) de 22 seqüências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 16 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições .....	79
Figura 19 - Análise da qualidade da seqüência parcial do gene <i>nodC</i> da estirpe de <i>Paraburkholderia</i> sp. C35-3 por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 576 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20) .....	82
Figura 20 - Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias parciais do gene <i>nodC</i> de 26 seqüências de bactérias	

isoladas do feijão-caupi e de 36 estirpes de referência (438 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições .....85

Figura 21 - Halo de solubilização de fosfato de cálcio formado por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa .....89



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Hipóteses .....	23
1.2 Objetivo geral .....	23
1.3 Objetivos específicos.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
2.1 Caatinga: localização, distribuição, condições edafoclimáticas e aspectos da vegetação ..	24
2.2 Feijão-caupi: aspectos gerais .....	26
2.3 Nitrogênio: um elemento essencial na nutrição de plantas.....	28
2.4 Fixação biológica de nitrogênio .....	30
2.5 Fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi .....	32
2.6 Diversidade de rizóbios que nodulam feijão-caupi .....	34
2.7 Técnicas moleculares utilizadas na avaliação da variabilidade genética de rizóbios, com ênfase nas técnicas utilizadas neste estudo.....	36
2.7.1 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudo de diversidade rizobiana.....	36
2.7.2 Multilocus Sequence Analysis (MLSA).....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	40
3.1 Critério de escolha das áreas, amostragem e caracterização físico-química dos solos .....	40
3.2 Experimento com planta-isca para a obtenção dos nódulos radiculares .....	50
3.3 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos .....	51
3.4 Caracterização genotípica.....	52
3.4.1 Extração de DNA.....	52
3.4.2 Amplificação de fragmentos do gene simbiótico <i>nodC</i> .....	52
3.4.3 Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA.....	53
3.4.4 Sequenciamento parcial de genes constitutivos e simbiótico.....	54
3.5 Testes bioquímicos .....	56

3.5.1 Produção de AIA .....	56
3.5.2 Produção de sideróforos .....	58
3.5.3 Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO <sub>4</sub> ).....	60
3.5.4 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono.....	60
3.5.5 Produção de biofilme.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1 Amplificação do gene <i>nodC</i> .....	63
4.2 Caracterização fenotípica dos isolados rizobianos .....	64
4.3 Diversidade genética de rizóbios de nódulos de feijão-caupi utilizando ARDRA.....	67
4.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA .....	70
4.5 Sequenciamento dos genes constitutivos <i>gyrB</i> e <i>recA</i> .....	75
4.6 Sequenciamento do gene simbiótico <i>nodC</i> .....	81
4.7 Produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato de cálcio e produção de biofilme “in vitro” .....	86
4.8 Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono .....	90
5 CONCLUSÕES .....	93
6 REFERÊNCIAS .....	94
APÊNDICE A – Dendrograma de similaridade genética de rizóbios de feijão-caupi gerado a partir do padrão de bandas da restrição do 16S rRNA digerido com as enzimas <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> e <i>Hin6I</i> . Dendrograma construído utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard. .	117

## 1 INTRODUÇÃO

A maior região semiárida da América do Sul encontra-se no Brasil (KIILL et al., 2013). Abrange uma área de 980.000 km<sup>2</sup> (GUSMÃO, 2016) que se distribui por estados como Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e parte do norte do estado de Minas Gerais (CASTRO; CAVALCANTE, 2011; SIQUEIRA FILHO, 2012; ARAÚJO FILHO, 2013). A caatinga é, neste ambiente, a principal formação vegetal (LIMA JÚNIOR et al., 2014). O clima característico da região faz dessa vegetação a floresta seca mais extensa da América do Sul e com limites inteiramente restritos ao território brasileiro (PAREYN, 2013).

A região é conhecida por suas adversidades climáticas, onde a escassez de água e a irregularidade temporal na distribuição das chuvas são muito comuns (QUEIROZ, 2009), e implicam diretamente na vegetação característica do bioma. Embora seus índices pluviométricos sejam baixos, e a evapotranspiração potencial possa alcançar os 2700 mm anuais (ARAÚJO FILHO, 2013), a caatinga apresenta grande variedade de paisagens e relativa riqueza biológica (ARAÚJO; SILVA, 2010), com solos extremamente diversos mesmo em escalas locais (SAMPAIO, 2010).

Em regiões semiáridas, o principal fator limitando à produtividade agrícola, depois da restrição hídrica, é a deficiência de N. Yahdjian, Gherardi e Sala (2011) relataram que em regiões áridas e semiáridas, a limitação do N é um fenômeno generalizado. Assim, as incertezas climáticas e o alto custo dos insumos tem contribuído para a redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados por agricultores familiares no Semiárido brasileiro e consequentemente para a redução da produtividade. Uma alternativa para aumentar a produtividade sem aplicação de fertilizantes químicos seria a inclusão de estirpes de rizóbios eficientes e adaptadas às condições locais, uso de espécies de leguminosas com potencial para a FBN e o manejo adequado da FBN nos sistemas agrícola e florestal.

Assim, estudos prévios que envolvem a caracterização fenotípica, bioquímica e molecular dos microssimbiontes responsáveis pela FBN em simbiose com leguminosas são importantes, para, a partir daí, realizar as etapas de avaliações quanto ao potencial simbiótico desses micro-organismos.

Na caatinga, a distribuição de leguminosas tem forte influência do tipo de substrato, com floras bem distintas entre áreas de embasamento cristalino e sedimentos arenosos (CARDOSO; QUEIROZ, 2007; COSTA et al., 2015). Juntamente com a variabilidade de condições edafoclimáticas, a diversidade de espécies de leguminosas da caatinga pode

proporcionar a manutenção de uma também igual diversa população de rizóbios nos solos do bioma. Estudos apontam que os solos do Semiárido brasileiro abrigam alta diversidade de rizóbio (SANTOS et al., 2007a; MARTINS et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014), mas informações sobre a estrutura dessas populações em estudos mais representativos são escassas.

Embora seja um bioma com grande diversidade de leguminosas, apenas poucas das espécies nativas da caatinga foram estudadas quanto à sua capacidade de FBN (TEIXEIRA et al., 2006; FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2012b; SOUZA et al., 2012b) e às características de seus microssimbiontes (TEIXEIRA et al., 2010; REIS JÚNIOR et al., 2010; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015; MENEZES et al., 2016). Assim, informações sobre a diversidade morfofisiológica e molecular de populações de bactérias nativas de solos dos diversos ambientes que compõem a caatinga ainda é desconhecida.

O que tem sido visto é que, muitas contribuições vêm sendo feitas no avanço do conhecimento da ecologia e diversidade de rizóbios em outros ecossistemas brasileiros, que inclusive levaram ao enriquecimento da taxonomia de rizóbios. Ao longo dos últimos anos, novas espécies de rizóbios foram descritas a partir de solos do Brasil, a exemplo: *Bradyrhizobium manausense* (SILVA et al., 2014), *Bradyrhizobium neotropiale* (ZILLI et al., 2014), *Bradyrhizobium ingae*, *Microvirga vignae* (RADL et al., 2014), *Rhizobium leucaenae* (RIBEIRO et al., 2012), *Rhizobium freirei* (DALL'AGNOL et al., 2013), *Rhizobium paranaense* (DALL'AGNOL et al., 2014). A espécie *Microvirga vignae* foi isolada a partir de solo do Semiárido brasileiro e mostrou potencial para promoção da produtividade de grãos de feijão-caupi via FBN (SILVA JÚNIOR et al., 2014). A descoberta de um novo membro do gênero *Microvirga* (uma alfa - proteobacteria) como simbiote eficiente de feijão-caupi em solo do Semiárido brasileiro aponta para um recurso ainda pouco explorado, tanto em termos de conhecimento (biodiversidade) como de aplicação biotecnológica (inoculantes microbianos).

Diante disso, visando traçar o perfil das populações de rizóbios estabelecidas na região, utilizou-se o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) como planta-isca não apenas por ser uma espécie de ampla faixa hospedeira (apresentando o caráter simbiótico de nodular com alfa e beta-rizóbios), mas também por ser estratégica para a gestão da FBN em sistemas agrícolas na região semiárida.

### **1.1 Hipóteses**

- Diferentes condições edafoclimáticas e de fitofisionomia do bioma Caatinga condicionam populações de rizóbios também diferenciadas.
- Solos do Semiárido brasileiro cobertos com vegetação nativa abrigam populações de rizóbios muito diversa.

### **1.2 Objetivo geral**

Avaliar as características das populações de alfa e beta-rizóbios naturalmente estabelecidas em solos do Semiárido de Pernambuco cobertos com vegetação nativa.

### **1.3 Objetivos específicos**

- Selecionar pontos amostrais representativos das principais condições edafoclimáticas do Semiárido de Pernambuco que apresentem cobertura de caatinga densa.
- Obter e caracterizar fenotipicamente uma coleção de rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido de Pernambuco, utilizando feijão-caupi como planta-isca.
- Determinar a diversidade e a estrutura genética de rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido de Pernambuco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caatinga: localização, distribuição, condições edafoclimáticas e aspectos da vegetação

O Semiárido brasileiro é o mais extenso da América do Sul (KIILL; TERAIO; ALVAREZ, 2013). Seu espaço geográfico de 980.000 km<sup>2</sup> (GUSMÃO, 2016) distribui-se por quase todos os estados da Região Nordeste do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), abrangendo ainda parte do norte do estado de Minas Gerais (CASTRO; CAVALCANTE, 2011; SIQUEIRA FILHO, 2012; ARAÚJO FILHO, 2013). Nesta região, a principal formação vegetal é a caatinga (LIMA JÚNIOR et al., 2014), que originalmente ocupava uma superfície de aproximadamente 850.000 km<sup>2</sup> (QUEIROZ, 2009), correspondendo a mais de 86 % da área coberta pelo Semiárido brasileiro. Segundo Pareyn (2013), a caatinga é a floresta seca mais extensa da América do Sul e tem seus limites inteiramente restritos ao território nacional.

As condições climáticas do bioma, como escassez de água durante uma grande parte do ano e a irregularidade temporal na distribuição das chuvas, implicam especialmente na vegetação característica da caatinga (QUEIROZ, 2009). Seus índices pluviométricos são baixos, com precipitações entre 250 e 800 mm ano<sup>-1</sup> (GUSMÃO et al., 2016). Em anos atípicos, muito chuvosos ou muito secos, a precipitação pode ultrapassar os 1000 mm ou ser inferior a 200 mm, respectivamente (MAIA, 2012).

Duas estações bastante distintas ficam bem delimitadas com a sazonalidade climática característica: uma estação chuvosa curta, com duração de três a cinco meses, e uma longa estação seca, o restante do ano (LIMA, 2012). Quanto a temperatura, a região é caracterizada por médias anuais elevadas, em torno de 27 °C (GUSMÃO et al., 2016), mas é possível, em serras e chapadas com altitudes acima de 500 m, verificar temperaturas mais baixas (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). No entanto, embora esteja inteiramente localizada no Semiárido nordestino, sob condições de clima quente e seco, com evapotranspiração potencial que pode alcançar os 2.700 mm anuais (ARAÚJO FILHO, 2013), a caatinga apresenta grande variedade de paisagens e relativa riqueza biológica (ARAÚJO; SILVA, 2010).

Os solos da caatinga, mesmo em escalas locais, são extremamente diversos (QUEIROZ, 2009), apresentando a maior variabilidade do país (SAMPAIO, 2010). Ao longo de toda sua extensão, é possível encontrar solos que se originam tanto de formações geológicas cristalinas quanto de formações geológicas sedimentares (ALVES et al., 2009). Em sua maioria, são solos rasos (pouco desenvolvidos) (ARAÚJO; SOUZA, 2011) e com afloramentos rochosos (ALVES

et al., 2009). Latossolo, Luvisolo, Argissolo, Neossolo Quartzarênico, Vertissolos, Neossolo Litólico, Planossolos, Neossolo Regolítico e Cambissolos são as classes de solos mais representativas do Semiárido brasileiro (RIBEIRO; SAMPAIO; GALINDO, 2009; ARAÚJO FILHO, 2013). Quanto ao relevo, a principal feição geomorfológica corresponde à das grandes depressões, também conhecida como depressão sertaneja (QUEIROZ, 2009). Assim, a diversificação em paisagens e tipos vegetacionais da caatinga é justificada, em parte, pelas variações geomorfológicas, climáticas e topográficas, que influenciam a distribuição, riqueza e diversidade de suas espécies vegetais (ARAÚJO FILHO, 2013).

A maioria das espécies da caatinga perdem suas folhas durante certa época do ano. A perda das folhas ao longo da paisagem seca faz com que os troncos esbranquiçados e brilhosos fiquem expostos, tornando o ambiente com um aspecto acinzentado e claro da vegetação (ALVES, 2007). Segundo esse mesmo autor, essa característica deve ter levado ao termo “caatinga”, que, em tupi-guarani, significa “mata branca”. É uma formação vegetal bastante heterogênea (MAIA, 2012) que varia de aberta a arbustiva até fechada e florestal (SANTOS et al., 2013). Suas espécies vegetais são xerófilas (ALVES et al., 2009), herbáceas, arbustivas e arbóreas de pequeno porte, geralmente dotadas de espinhos (ARAÚJO FILHO, 2013).

Devido às adversidades climáticas da região, muitos vegetais ocorrentes nesse ambiente desenvolveram estratégias adaptativas. Em algumas espécies, a perda de água é minimizada pela redução da superfície foliar que ocorre tanto com a perda da folha ou sua transformação em espinhos, quanto pela presença de folhas compostas com folíolos reduzidos (QUEIROZ, 2009). Outras estratégias desenvolvidas por alguns vegetais são o armazenamento de água, que pode ser realizado em caules (barriguda), tecidos verdes (cactáceas) e raízes (umbuzeiro) (MAIA, 2012), e a presença de entrecasca clorofilada que consegue manter um certo nível de atividade fotossintética mesmo estando sem folhas (QUEIROZ, 2009).

Ao longo dos últimos anos houve um acréscimo considerável no número de espécies vegetais da caatinga, de modo que, mais de 4600 espécies já foram catalogadas, das quais 913 são endêmicas (ZAPPI et al., 2015). Espécies pertencentes aos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Caesalpiniae*, *Senna*, *Croton*, *Cnidoscolus*, *Jatropha*, *Cereus*, *Pilosocereus*, *Melocactus* e *Tacinga*, são as mais representativas na composição do estrato arbóreo e arbustivo da caatinga (QUEIROZ, 2006). Nesse bioma, Fabaceae é uma das famílias mais importantes devido a sua grande contribuição para a diversidade florística (QUEIROZ, 2009), já que estão catalogadas mais de 600 espécies de leguminosas (ZAPPI et al., 2015), e com alto grau de endemismo (QUEIROZ, 2006).

## 2.2 Feijão-caupi: aspectos gerais

Dentro do gênero *Vigna*, a espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e espécies silvestres, mesmo geneticamente mais próximas, apresentam grande variabilidade genética. Segundo Freire Filho (2011), provavelmente essa tenha sido a razão que inicialmente dificultou a classificação da espécie domesticada. Um reflexo dessa dificuldade é que nas primeiras classificações o feijão-caupi foi incluído em gêneros como *Phaseolus* e *Dolichos*. Hoje, sua classificação no gênero *Vigna* é mundialmente aceita (FREIRE FILHO, 1988).

A nível de espécie, muitas classificações também foram realizadas até que se chegasse à atual. Assim, a classificação cientificamente aceita é que o feijão-caupi é uma planta Dicotyledonea, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção *Catyang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., subespécie *unguiculata* e subdivisão em quatro cultigrupos (*Unguiculata*, *Sesquipedalis*, *Biflora* e *Textilis*) (PADULOSI; NG, 1997; SMARTT, 1990; VERDCOURT, 1970). Os cultigrupos ocorrentes no Brasil são: *Unguiculata*, utilizado tanto para a produção de grão seco quanto verde, e *Sesquipedalis*, comumente conhecido como feijão-de-metro e cultivado para a produção de vagem (FREIRE FILHO, 2011).

O feijão-caupi apresenta-se em diversas cores, formas e nomes. Feijão-macassa é provavelmente a denominação mais antiga e difundida no Brasil. Outras denominações são: feijão-de-corda; feijão-vigna; feijão-de-praia; caupi (trata-se do aportuguesamento do nome “cowpea”, palavra em inglês que traduzido significa ervilha-de-vaca); feijão-fradinho; feijão-da-colônia; feijão-manteiga; feijão-verde; feijão-de-estrada; feijão-miúdo; feijão-pardo; feijão-coquinho (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983), feijão-gurutuba; feijão-catador (FREIRE FILHO, 2011).

Alguns países e regiões levantados na literatura por Steele e Mehra (1980) são sugeridos como centro de origem da espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., tais como: Oeste da África; centro e sul da África; Oeste e centro da África; África e Etiópia; Índia e África; Noroeste da Índia, Paquistão e Irã; Índia e Etiópia; Índia. Os mesmos autores constataram que, mesmo havendo muitas possibilidades do centro de origem da espécie, regiões da África são maioria entre as diversas proposições citadas. Sendo assim, há um consenso de que o feijão-caupi seja de origem africana. Além disso, um fato que fortalece ainda mais essa teoria é que as formas selvagens da espécie não têm sido encontradas fora do continente africano.

As migrações e rotas comerciais favoreceram a dispersão do feijão-caupi para outras regiões do continente africano bem como para outros continentes. No continente americano,

por exemplo, o feijão-caupi foi introduzido por colonizadores espanhóis e portugueses ainda na segunda metade do século XVI. Após ser difundido nas colônias espanholas, o feijão-caupi foi introduzido no Brasil provavelmente pelo estado da Bahia (FREIRE FILHO, 2011). Sua disseminação no país ocorreu em paralelo à colonização, de modo que seu cultivo passou a ser praticado em todas as regiões. Diante da oportunidade de cultivar vários tipos de feijões, como fava (*Phaseolus lunatus* (L.)) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* (L.)), possivelmente aliado a outros fatores, fez com que os agricultores passassem a cultivar com maior frequência aquelas espécies com maior aceitação e mais adaptadas às suas regiões. Isso fez com que o cultivo do feijão-caupi se concentrasse nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (FREIRE FILHO, 1988).

Segundo dados da FAO (FAOSTAT, 2017), a área plantada com feijão-caupi no ano de 2017 foi de 12,5 milhões de hectares (ha), o que correspondeu a uma produção mundial de 7,4 milhões de toneladas do grão seco. Esse mesmo levantamento aponta o continente africano como o maior produtor mundial de feijão-caupi (95,9%), com destaque para a Nigéria (3,4 milhões de toneladas), Níger (1,9 milhões de toneladas) e Burkina Faso (603 mil toneladas).

No Brasil, ao longo dos últimos anos, o feijão-caupi tem adquirido maior expressão econômica principalmente com a expansão das áreas de cultivo em direção ao cerrado (SILVA JÚNIOR et al., 2018). Nessas áreas a cultura tem sido introduzida na “safrinha” e até mesmo como cultura principal (FREIRE FILHO, 2011). Resultados preliminares apresentados pelo IBGE (2018) no último censo agropecuário, apontam Mato Grosso, Minas Gerais e Ceará como os estados com maior produção.

O cultivo no estado do Mato Grosso tem sido cada vez mais frequente (SILVA JÚNIOR et al., 2018). Com isso, a expansão das áreas têm feito com que seu cultivo seja praticado não apenas por pequenos, mas também por médios e grandes produtores que, conseqüentemente, passaram a utilizar maior aporte tecnológico. O emprego de tecnologias que permitem à expressão do potencial produtivo da cultura, como a irrigação, têm sido um diferencial para a produtividade em alguns estados. No Mato Grosso, por exemplo, a produtividade alcançada na safra 2018/2019 foi superior a 1.000 kg ha<sup>-1</sup> (Safra 2018/2019), enquanto a produtividade média do Brasil foi de 516 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2019).

Embora a maior produção tenha sido atribuída ao estado do Mato Grosso (região Centro-Oeste), o maior número de estabelecimentos agropecuários produtores de feijão-caupi encontra-se na região Nordeste. Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte são oito dos dez estados listados com o maior número de estabelecimentos agropecuários produtores da cultura (IBGE, 2018). Nessa região, a maior produção tem sido do cultivo por pequenos agricultores, caracterizando, muitas vezes, uma

agricultura de base familiar. Devido ao seu alto valor nutritivo (principalmente como fonte de proteína) e ampla adaptabilidade às condições tropicais, a cultura assume grande importância na fixação de mão-de-obra e geração de emprego e renda no campo. Segundo Nascimento et al. (2010), o feijão-caupi é a cultura granífera de maior importância para o Semiárido brasileiro, principalmente por ser uma das principais culturas de subsistência.

Conforme informação disponível no Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, atualmente 47 cultivares de feijão-caupi encontram-se registradas para o cultivo no Brasil. Alguns exemplos são: BRS Pujante, BRS Potiguar, BRS Rouxinol, BRS Guariba, BRS-Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS – Mazagão, BRS Pajeu, BRS Xiquexique, IPA 205, BR 14-Mulato, BRS Novaera, BRS Carijó, BRS Tapaihum, IPA 206 e BRS Imponente (BRASIL, 2019). Além destes, muitos outros genótipos crioulos são cultivados em diversos estados, tais como: Comercio Crato, Costelão, Canapu Ligeiro, Canapu Verdadeiro, Zé Matias e Beira Rio, cultivadas no Cariri Cearense (BEZERRA et al., 2017), Sedinha, Corujinha, Canapu, Sempre Verde e Azul, cultivadas em comunidades de agricultores familiares do agreste da Paraíba (VIEIRA et al., 2010; FREITAS; SILVA; SAMPAIO, 2012).

### **2.3 Nitrogênio: um elemento essencial na nutrição de plantas**

O maior reservatório de nitrogênio (N) do planeta é a litosfera, que contém uma massa de  $1 \times 10^{23}$  g de N (98 % do N existente). A atmosfera, segundo maior reservatório, tem um estoque estimado em  $3,9 \times 10^{21}$  g de N (78 % do seu volume) na forma de nitrogênio molecular ( $N_2$ ) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), um gás quimicamente muito estável. Sua baixa reatividade química, decorrente da ligação covalente existente entre os átomos da molécula ( $N \equiv N$ ), impede que esse gás seja diretamente utilizado por plantas e animais (BRADY; WEIL, 2013).

A conversão do  $N_2$  em formas reativas, que inclui qualquer outra forma de N prontamente disponível aos organismos vivos, ocorre por processos naturais (ação de descargas elétricas e fixação biológica de nitrogênio (FBN)) ou pela industrialização (também chamado de processo Haber-Bosch). Por outro lado, conforme exposto por Trivelin e Franco (2011), têm-se como saídas: remoção e exportação pelas colheitas; perda na forma de óxidos ( $N_2O$ , NO,  $NO_2$ ), amônia e  $N_2$  decorrente da queima de restos culturais; lixiviação de formas minerais (especialmente o nitrato ( $NO_3^-$ )); desnitrificação e perdas gasosas por volatilização e folhagens.

Embora não seja considerada uma forma de perda, a imobilização deixa o nutriente temporariamente indisponível.

Em sistemas agrícolas e naturais, a matéria orgânica do solo (MOS) é uma importante fonte desse nutriente. A maior parte do N do solo (95 % do N total) encontra-se em diferentes moléculas orgânicas. A fração inorgânica é constituída principalmente por  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , porém, em algumas situações, é possível constatar a presença de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). A presença de gases como o  $\text{N}_2$ , mesmo que sendo em proporções menores, também é constatada na atmosfera e solução do solo. As reações que envolvem o N ligado a MOS são predominantemente mediadas por micro-organismos, os quais, são diretamente afetados por condições ambientais e climáticas (CANTARELLA, 2007).

Ao levar em consideração todos os elementos que passam pelo sistema solo-planta-atmosfera, o N é, sem dúvidas, o elemento que passa pelo maior número de transformações bioquímicas. Três subciclos estão inseridos no seu ciclo universal, os quais são denominados de elementar, autotrófico e heterotrófico. O subciclo elementar é representado pela desnitrificação e FBN, envolvendo, portanto, a conexão de organismos e compartimentos como a atmosfera. O subciclo autotrófico inclui o metabolismo das plantas, cuja atividade produz substratos primários que podem ser utilizados por indivíduos do subciclo heterotrófico (micro-organismos decompositores) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na natureza o N apresenta-se em seis níveis de oxidação ou estado de valência:  $\text{NH}_3$  (amônia; valência -3);  $\text{HONH}_2$  (hidroxilamina; valência -1);  $\text{N}_2$  (dinitrogênio; valência 0);  $\text{HNO}$  (nitroxila; valência +1);  $\text{NO}_2^-$  (nitrito; valência +3) e  $\text{NO}_3^-$  (nitrato; valência +5). Essa característica faz com que o N desempenhe seu complexo papel nos processos vitais (TRIVELIN; FRANCO, 2011).

Por fazer parte de múltiplas funções na planta (metabólicas e estruturais), o N é o macronutriente requerido em maior quantidade pela maioria das espécies cultivadas (CANTARELLA, 2007), na ordem de  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria seca do vegetal (DECHEN; NACHTIGALL, 2007). Alguns componentes nitrogenados de importância incluem proteínas, ácidos nucleicos e clorofila (BRADY e WEIL, 2013). Sua participação na massa de material vegetal seco fica entre 1 e 3 % que, ao somar-se aos elementos carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), passam a representar, juntos, mais de 90 % dessa matéria (TRIVELIN; FRANCO, 2011), sendo, portanto, o quarto elemento mais abundante nas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2008). Sua absorção pelos vegetais tem sido principalmente nas formas iônicas ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) (SANTOS et al., 2008; BRADY; WEIL, 2013).

Por ser um dos elementos que mais tem limitado à produtividade das culturas, tornou-se cada vez mais frequente o uso de fertilizantes nitrogenados industrializados, representando, portanto, um dos mais altos custos de produção para o agricultor. Diante disso, muitos estudos são realizados a fim de encontrar a melhor dose (VASCONCELOS et al., 2015; LIMA et al., 2016), fonte (LORENSINI et al., 2014; MARCON et al., 2017) e época de aplicação do elemento (SOUZA et al., 2012a; NASCENTE et al., 2017), em diferentes culturas, com a finalidade de se obter o melhor aproveitamento e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção.

Além do alto custo de produção, esses fertilizantes são responsáveis por causar impactos ambientais. Diante disso, muito tem sido feito em relação à busca por microssimbiontes competitivos e eficientes na FBN. Por ser um processo de baixo custo e ecologicamente correto, a FBN têm proporcionado em culturas como a soja (*Glycine max* (L.)), uma economia de bilhões de dólares pela redução do uso de fertilizantes nitrogenados industrializados. Observa-se, além disso, que os ganhos com a FBN vão além da redução dos custos de produção, é um processo que traz benefícios ecológicos.

## **2.4 Fixação biológica de nitrogênio**

A FBN é considerada por muitos estudiosos como o segundo processo biológico mais importante do planeta, sendo superada apenas pela fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CANTARELLA, 2007; REIS-JÚNIOR et al., 2011; ZAGO et al., 2018). O processo é caracterizado pela redução do nitrogênio molecular ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ), uma forma inorgânica combinada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; HOFFMANN, 2007; CANTARELLA, 2007), que, posteriormente, é convertida em outras formas reativas (orgânicas e inorgânicas), essenciais em sistemas biológicos. Esse processo é catalisado por alguns procariotos cujo principal hábitat é o solo (HUNGRIA et al., 2015), e só é possível graças a capacidade que esses micro-organismos têm de sintetizar a nitrogenase, um complexo enzimático responsável por transferir elétrons até a completa redução do  $N_2$ .

Duas unidades básicas fazem parte da nitrogenase: uma Fe-proteína, que acopla a hidrólise de ATP para que ocorra a transferência de elétrons durante a reação, e FeMo-proteína, que fornece o sítio ativo para que o substrato seja reduzido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BALDANI et al., 2009). No entanto, para que a FBN seja possível, além da nitrogenase, se fazem necessários a presença de redutores fortes (ferrodoxina e flavodoxina) e uma via assimilatória de  $NH_3$  (CORDEIRO, 2004). Devido à baixa especificidade por substrato, além

do N<sub>2</sub>, a nitrogenase também é capaz de reduzir outras moléculas com tripla ligação. Essa habilidade tem possibilitado a avaliação qualitativa da atividade da enzima por meio da redução do acetileno (REIS et al., 2010). É uma enzima que atua em temperatura ambiente e pressão normal (SANTOS et al., 2008).

Embora muitos genes estejam envolvidos na FBN, os genes *fix*, *nif*, e *nod* têm sido relatados como os principais envolvidos no processo (SHAMSELDIN, 2013). Os genes *fix* são responsáveis pela regulação da transcrição dos genes *nif*, que, por sua vez, estão envolvidos na biossíntese, estrutura e regulação da nitrogenase. Os genes *nod*, como o próprio nome sugere, são requeridos para a nodulação, e só são encontrados em bactérias formadoras de nódulos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estão, portanto, envolvidos na síntese dos chamados fatores da nodulação (Fator nod), que são os lipo-quitto-oligossacarídeos (LQO) (CASSETARI; SILVA; CARDOSO, 2016).

A parcela de procariotos que realiza a FBN, também conhecidos como diazotróficos, pode realizar o processo de três diferentes formas. São micro-organismos que realizam a FBN desde em vida livre, utilizando fontes de carbono prontamente disponíveis no ambiente, sem a necessidade de um hospedeiro, até aqueles que estabelecem relações mais específicas ao habitar a superfície ou o interior de tecidos vegetais (associativos facultativos ou obrigatórios), ou mesmo apresentar uma relação ainda mais específica com algumas espécies de leguminosas (simbiontes) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MOREIRA et al., 2010; REIS et al., 2010).

Devido à importância dos diazotróficos para o suprimento de N em diversos ecossistemas, muitas espécies já foram descritas, tais como: *Rhizobium leguminosarum*, *R. endophyticum*, *Ensifer meliloti*, *Microvirga zambiensis*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Burkholderia tuberum*, *Cupriavidus taiwanensis* (BERRADA; BENBRAHIM, 2014), *Herbaspirillum seropedicae*, *Beijerinckia fluminensis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Azospirillum brasiliense*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. (MOREIRA et al., 2010), *Beijerinckia indica*, *Azotobacter chroococcum*, *A. paspali* (OLIVEIRA et al., 2008), *Rhodobacter capsulatus* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e *Derrxia* spp. (MOREIRA et al., 2010), entre outras. Com o advento e a popularização de técnicas de biologia molecular, a melhor compreensão da taxonomia destes micro-organismos tem crescido significativamente a cada ano. O estudo da diversidade não tem sido o único foco, a busca por indivíduos eficientes na FBN também tem sido relatada na literatura (COSTA et al., 2014a; MARINHO et al., 2014).

Entre as espécies de leguminosas, a soja é uma das culturas que tem recebido grande contribuição da FBN no Brasil (REIS-JÚNIOR et al., 2011). Os mesmos autores relataram que

para produzir 1000 kg de soja, com 6,5 % de N (grãos + parte vegetativa), são necessários, pelo menos, 80 kg de N e que a contribuição da FBN para a cultura é algo em torno de 85 % do N total acumulado. Sendo assim, levando em consideração a produtividade média de 3333 kg ha<sup>-1</sup> alcançada na safra 2017/2018 (CONAB, 2019), seriam necessários cerca de 266 kg de N ha<sup>-1</sup>. A parcela de contribuição da FBN seria, portanto, cerca de 226 kg de N ha<sup>-1</sup>, o equivalente a 502 kg de ureia ha<sup>-1</sup> uma vez que esse fertilizante contém 45 % de N. Com a cotação da ureia a 390 U\$ t<sup>-1</sup> (Cotação em outubro de 2017), seriam gastos 6,8 bilhões de dólares apenas com o uso de ureia nos 35 milhões de ha cultivados com soja no Brasil (CONAB, 2019). Se levarmos em consideração que o aproveitamento do fertilizante nitrogenado é de aproximadamente 50 %, devido a processos de imobilização, perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação, essa economia seria de 13,6 bilhões de dólares.

Esse sucesso só foi possível pois desde a introdução da cultura no Brasil, na década de 1950, um processo de seleção de estirpes de rizóbio eficientes para a soja foi sendo realizado concomitantemente ao melhoramento genético da cultura, sendo a responsividade dos genótipos à inoculação com rizóbios uma característica avaliada na seleção (FREIRE; VERNETTI, 1999). Atualmente, as respostas menos consistentes à tecnologia de inoculação de algumas leguminosas tropicais cultivadas no Brasil, como o feijoeiro-comum e o feijão-caupi, se deve em parte, à ausência da incorporação da FBN nos programas de seleção e melhoramento genético desde há vários anos. Para estas culturas, a seleção das características relativas à FBN está sendo incorporado tardiamente ao melhoramento genético (ALCÂNTARA et al., 2014; KNUPP; FERREIRA; ARAÚJO, 2017) o que levará alguns anos para a disseminação desta característica na genética destas espécies disponíveis aos produtores.

## **2.5 Fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi**

Visando potencializar a produtividade e tornar seu cultivo mais sustentável, atualmente quatro estirpes de rizóbios encontram-se autorizadas para a produção de inoculantes comerciais destinados à cultura do feijão-caupi no Brasil, a saber: INPA3-11B (SEMIA 6463) e UFLA 3-84 (SEMIA 6461) (LACERDA et al., 2004) (provenientes da coleção de bactérias do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo – SBMPBS da Universidade Federal de Lavras – UFLA); BR 3267 (SEMIA 6462) (MARTINS et al., 2003) e BR 3262 (SEMIA 6464) (ZILLI et al., 2009) (oriundas do Centro de Recursos Genéticos Johanna Döbereiner/CRB-JD da Embrapa Agrobiologia). Após serem aprovadas pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes

Microbianos de Interesse Agrícola - RELARE, as estirpes foram reconhecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e incluídas na listagem oficial de bactérias autorizadas para a produção de inoculantes no anexo I da Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (BRASIL, 2011).

As quatro estirpes recomendadas para a cultura do feijão-caupi pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, sendo: INPA 03-11B e UFLA 03-84, ambos *Bradyrhizobium* sp. (SILVA JÚNIOR et al., 2018), BR 3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*) e BR 3262 (*Bradyrhizobium pachyrhizi*) que foram identificadas recentemente a nível de espécie por Leite et al. (2018). A planta hospedeira utilizada para a obtenção dos nódulos e posterior isolamento da BR 3262, BR 3267 e ULFA 3-84 foi o feijão-caupi, enquanto que para a INPA3-11B foi a *Centrosema* sp.. A estirpe BR 3267 foi isolada de solo do Semiárido pernambucano no município de Petrolina e a BR 3262 de solo de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica em Seropédica, RJ. Terra firme (Manaus, AM) e pastagem (Ji-Paraná) foram os sistemas de uso da terra de onde as estirpes INPA3-11B e ULFA 3-84 foram obtidas, respectivamente.

Desde que as condições sejam adequadas para o estabelecimento da simbiose, todas as estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais destinados à cultura do feijão-caupi são capazes de proporcionar incrementos na produtividade. No entanto, fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes, déficit hídrico e competitividade com micro-organismos nativos são alguns dos fatores citados por Ferreira et al. (2013), que podem limitar a (FBN) e, conseqüentemente, a eficiência da inoculação de estirpes recomendadas. Marinho et al. (2017), estudando a eficiência agrônômica de rizóbios de feijão-caupi, variedade BRS 17 Gurguéia, verificaram que a estirpe BR 3267 proporcionou produtividade de 2007 kg ha<sup>-1</sup>, 30 % a mais em relação ao tratamento que recebeu nitrogênio mineral. Ganhos de produtividade também foram verificados por Gualter et al. (2011) ao estudar a eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio na região da Pré-Amazônia maranhense. Segundo os autores, as estirpes BR 3262 e INPA3-11 apresentaram desempenho semelhante ao tratamento nitrogenado e superior à população nativa. Conforme citado anteriormente, nem sempre a prática da inoculação vai garantir aumento na produtividade. Costa et al. (2014a) verificaram baixos rendimentos com a inoculação das estirpes INPA3-11B, BR 3267 e BR 3262.

Chaves et al. (2018) verificaram que a estirpe BR3262 promoveu rendimento de grãos 11 % superior à aplicação de 30 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na forma mineral. Segundo Silva-Júnior et al. (2018), a inoculação de feijão-caupi com estirpes referência na região do Cerrado pode incrementar a FBN e o rendimento de grãos da cultura mesmo quando há uma população estabelecida de rizóbios provenientes do cultivo de soja. Freitas et al. (2012a), avaliando o

potencial de FBN em 6 variedades de feijão-caupi, observaram que do total de N absorvido por cada variedade, mais de 40 % foi derivado da FBN. Para a variedade costela de vaca, 79 % do N absorvido foi via FBN, representando um aporte de 45 kg ha<sup>-1</sup> de N. Em estudo realizado por Nascimento et al. (2010), dos 13 isolados de rizóbios nativos de solos da região semiárida da Paraíba, 12 foram tão eficientes quanto a estirpe BR3267, recomendada para a cultura do feijão-caupi.

A eficiência agrônômica de rizóbios inoculados em feijão-caupi (cv BR 17 Gurguéia) também foi verificada por Almeida et al. (2010). Os autores constataram que a estirpe BR3299<sup>T</sup> de *Microvirga vignae* foi tão eficiente em promover a produtividade da cultura quanto às estirpes recomendadas INPA3-11B, BR3267 e BR3262. Além disso, constatou-se que a estirpe INPA3-11B promoveu produtividade de 1.954 kg ha<sup>-1</sup>, um ganho produtivo de 37 % em relação ao controle nitrogenado (80 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio mineral). Ao avaliar a nodulação natural de feijão-caupi em um Latossolo de Roraima, Bastos et al. (2012) verificaram que algumas práticas de manejo podem influenciar no estabelecimento da simbiose. Segundo os autores, a aplicação de esterco bovino, independente das formas de manejo da vegetação natural, aumentou a nodulação das plantas de feijão-caupi. Quanto ao manejo da vegetação natural, os autores verificaram que o tratamento sem corte apresentou redução significativa do número de nódulos em relação ao uso do corte e a dessecação com glifosato. Outro fator que tem exercido influência na FBN é genótipo da planta (MARINHO et al., 2017; FREITAS; SILVA; SAMPAIO, 2012; ALCANTARA et al., 2014; COSTA et al., 2014b).

Embora a FBN na cultura do feijão-caupi em campo seja bastante variável, incrementos na produtividade podem ser evidenciados, na maioria dos casos, quando se utilizam estirpes eficientes e que sejam competitivas com a população nativa estabelecida em cada local de cultivo. Nessas condições, a prática da inoculação pode chegar a substituir totalmente a adubação nitrogenada, inclusive a dose de arranque (aplicado na semeadura) (BRITO et al., 2010), o que representa grande redução nos custos de produção.

## **2.6 Diversidade de rizóbios que nodulam feijão-caupi**

Rizóbios de nódulos de feijão-caupi são muito diversos quanto às características morfofisiológica, bioquímica e genotípica. São bactérias cujas colônias variam em tamanho, forma, cor, aparência, transparência e elevação da colônia, além de apresentarem diferentes comportamentos quanto ao tempo de crescimento e alteração do pH do meio. Vários estudos têm demonstrado que esse grupo de micro-organismos são capazes de utilizar diferentes fontes

de carbono (habilidade que facilita a colonização e a competição no solo), toleram diferentes temperaturas, faixas de pH e concentrações de sal, apresentam resistência intrínseca a antibióticos e metais pesados, solubilizam fosfato (ABDELNABY et al., 2015; DEGEFU et al., 2018), produzem auxinas (CHAGAS-JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009; CHAGAS-JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010; COSTA et al., 2013), sideróforos e biofilme (SENA, 2018).

Embora seja nodulado preferencialmente por rizóbios da classe das alfa-proteobactérias (SILVA et al., 2012; TAMPAKAKI et al., 2017a; NDUNGU et al., 2018), a espécie *Vigna unguiculata* L. (Walp) também tem estabelecido simbiose com rizóbios da classe das beta-proteobactérias (GUIMARÃES et al., 2012; CASTRO et al., 2017). Desse modo, tendo em vista sua ampla faixa hospedeira, estudos de diversidade rizobiana utilizando feijão-caupi como planta-isca tornaram-se cada vez mais frequentes (SILVA et al., 2014; ABDELNABY et al., 2015; CASTRO et al., 2017). Isso têm possibilitado a descrição de muitas espécies rizobianas capazes de nodular a cultura e que estão distribuídas em gêneros como *Microvirga* (RADL et al., 2014), *Cupriavidus* (CASTRO et al., 2017), *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia* (GUIMARÃES et al., 2012), *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (TAMPAKAKI et al., 2017b).

Nos últimos anos, muitas espécies de rizóbios foram descritas a partir de solos do Brasil, o que têm demonstrado a importância dos solos do país como um potencial repositório de novas espécies. Para o feijão-caupi, o enriquecimento de sua diversidade rizobiana pode ser constatado com a descrição de espécies como: *Bradyrhizobium manausense*, obtida de solo da floresta Amazônica (SILVA et al., 2014); *Microvirga vignae*, isolada de um Luvissole do município de Canindé do São Francisco, Semiárido brasileiro (RADL et al., 2014); e *Bradyrhizobium brasilense*, nativa de um sistema agroflorestral da Amazônia (COSTA et al., 2017). Novas espécies de rizóbios de solos do continente africano, provável centro de origem do feijão-caupi, também foram descritas: *Bradyrhizobium vignae* (GRONEMEYER et al., 2016) e *Bradyrhizobium kavangense* (GRONEMEYER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2015), isoladas de solo com agricultura de subsistência na região do Okavango, Namíbia.

A diversidade de rizóbios capazes de nodular feijão-caupi vai além dos isolados obtidos a partir de seus nódulos radiculares. Alguns estudos têm demonstrado a habilidade da cultura em estabelecer simbiose com rizóbios isolados a partir de nódulos de outras leguminosas. Santos et al. (2007b), avaliando a especificidade de rizóbios isolados de *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*, verificaram que isolados obtidos de nódulos de *Arachis* e *Stylosanthes* foram capazes de estabelecer simbiose também com o feijão-caupi. Levando em consideração a indicação equivocada de inoculantes de soja para serem

utilizados em feijão-caupi, Zilli et al. (2011) decidiram avaliar as respostas da cultura inoculada com as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019. Os autores verificaram que todas as estirpes estabeleceram simbiose com o feijão-caupi. O estabelecimento da simbiose do feijão-caupi com rizóbios isolados de outros hospedeiros também pode ser constatado em uma de suas estirpes recomendadas, como é o caso da estirpe INPA3-11B, que tem como hospedeiro de origem a *Centrosema* sp..

O estudo da diversidade de rizóbios e, conseqüentemente, a busca por isolados nativos de regiões secas, conforme verificado no Semiárido brasileiro, tem sido cada vez mais frequente por serem micro-organismos adaptados às condições adversas da região. Além disso, a variabilidade de condições edafoclimáticas e de espécies vegetais, principalmente leguminosas, ocorrentes nesse ambiente é muito grande. Isso tem permitido que solos dessa região abriguem uma população muito diversa de rizóbios simbiotes não apenas de feijão-caupi (LEITE et al., 2009; MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997), mas também de espécies como *Cratylia mollis*, *Calliandra depauperata* (TEIXEIRA et al., 2010), *Arachis hypogaea* (SANTOS et al., 2017), *Erythrina velutina* (MENEZES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018), *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa paraibana* (FREITAS et al., 2014). A influência de propriedades do solo na diversidade de rizóbio tem sido descrita recentemente por Dlundu et al. (2018a). Os autores verificaram que na África do Sul, o gênero *Burkholderia* ocorre preferencialmente em solos ácidos e pobres em nutrientes enquanto que *Mesorhizobium* ocorre tanto em solos ácidos quanto alcalinos. O pH, tipo de solo e conteúdo de nutrientes também foram relatados por Mason et al. (2018), como propriedades do solo influenciadoras da diversidade de *Bradyrhizobium* nas Filipinas.

## **2.7 Técnicas moleculares utilizadas na avaliação da variabilidade genética de rizóbios, com ênfase nas técnicas utilizadas neste estudo**

### **2.7.1 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudo de diversidade rizobiana**

Devido à importância dos rizóbios para a sustentabilidade de ecossistemas terrestres, contribuições vêm sendo feitas no avanço do conhecimento da diversidade desses micro-organismos. São estudos que envolvem etapas que vão desde a caracterização fenotípica, fisiológica e bioquímica, até o uso de ferramentas moleculares que permitem uma identificação mais precisa do microssimbionte. Amplificação de regiões repetidas e conservadas do DNA:

REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (STERN et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (HULTON; HIGGINS; SHARP, 1991) e BOX-PCR (MARTIN et al., 1992), bem como o sequenciamento de genes (16S rRNA, *recA*, *gyrB*, *atpD*, *nodC*) e análise de polimorfismo por RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), são exemplos de técnicas moleculares utilizadas ao longo dos últimos anos em estudo de diversidade rizobiana.

A Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), é uma técnica que consiste na prévia amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de fragmentos como do DNA ribossomal (16S rRNA, 23S rRNA e região intergênica (16S-23S rRNA)), com a posterior digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição, ou endonucleases, sendo, portanto, uma técnica de PCR aliada ao RFLP (XU et al., 2015). Segundo Dall’Agnol (2016), a amplificação prévia de um gene, antes do mesmo ser submetido a clivagem por endonucleases, têm aumentado o poder discriminatório.

No entanto, é preciso ter cautela na escolha do gene que será analisado por esse método, sendo, portanto, necessário conhecer com antecedência a coleção a ser estudada. Quando se pretende trabalhar com micro-organismos com elevada afinidade genética (ex: indivíduos do mesmo gênero), é interessante que o fragmento utilizado para a amplificação e clivagem seja a região do espaço intergênico (IGS) 16S-23S rRNA (SENA, 2018). A maior variabilidade em composição de bases e tamanho, quando comparada com os genes 16S ou 23S rRNA, faz do IGS um fragmento com maior poder de discriminação dos indivíduos. Quando se tem informações de que a coleção é constituída por isolados filogeneticamente distantes, pode ser utilizado o 16S ou 23S rRNA (REIS-JÚNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2004).

Muitos trabalhos envolvendo o estudo da diversidade rizobiana tem feito uso do ARDRA por ser uma ferramenta que permite o agrupamento filogenético dos indivíduos. A técnica tem sido utilizada para acessar a diversidade de rizóbios associados a diferentes espécies e ambientes, tais como: nativos de áreas poluídas com metais (AAFI et al., 2015), de regiões áridas e semiáridas do Senegal (BAKHOUM et al., 2014), populações de áreas revegetadas após mineração de bauxita (BORGES et al., 2016), associados à *Desmodium* spp. na China (XU et al., 2016), *Bradyrhizobium* nodulando soja nas Filipinas (MASON et al., 2018) e nativos de solos do semiárido do Brasil (LEITE et al., 2009).

As enzimas envolvidas na análise de restrição são endonucleases que clivam o DNA em sítios específicos, geralmente, em regiões palindrômicas (ANDRADE; FELEIRO, 2011). Os fragmentos gerados podem ser analisados em gel de agarose e visualizados utilizando corante como o SYBR Gold®. *AluI* (5'-AG<sup>^</sup>CT-3'; 3'-TC<sup>^</sup>GA-5'), *HaeIII* (5'-GG<sup>^</sup>CC-3'; 3'-CC<sup>^</sup>GG-

5'), *HhaI* (5'-GCG<sup>^</sup>C-3'; 3'-C<sup>^</sup>GCG-5'), *Hinfl* (5'-G<sup>^</sup>ANTC-3'; 3'-CTNA<sup>^</sup>G-5'), *MspI* (5'-C<sup>^</sup>CGG-3'; 3'-GGC<sup>^</sup>C-5'), *RsaI* (5'-GT<sup>^</sup>AC-3'; 3'-CA<sup>^</sup>TG-5'), *TaqI* (5'-T<sup>^</sup>CGA-3'; 3'-AGC<sup>^</sup>T-5'), *EcoRI* (5'-G<sup>^</sup>AATTC-3'; 3'-CTTAA<sup>^</sup>G-5'), *MboI* (5'-G<sup>^</sup>ATC-3'; 3'-CTA<sup>^</sup>G-5'), *HpaII* (5'-C<sup>^</sup>CGG-3'; 3'-GGC<sup>^</sup>C-5') (TEIXEIRA et al., 2010; XU et al., 2015; EFROSE et al., 2018; KOSKEY et al., 2018), são exemplos de algumas endonucleases utilizadas em estudo de diversidade rizobiana. O uso de diversas enzimas de restrição, possibilitando o acesso a distintos sítios polimórficos, também tem sido relatado como uma forma de potencializar a discriminação entre as estirpes (DALL'AGNOL, 2016).

O ARDRA é uma técnica de alto poder discriminatório, baixo custo e fácil execução, o que o torna muito apropriada para o agrupamento filogenético dos isolados preliminar a outras técnicas, como o sequenciamento de genes, por exemplo.

### 2.7.2 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

O emprego de técnicas de biologia molecular entre as décadas de 1980 e 1990, resultou em uma verdadeira revolução da taxonomia de bactérias e fungos (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010). Nessa época alguns estudos foram conduzidos com genes ribossomais (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WEISBURG et al., 1991), os quais, nas bactérias, recaiu no 16S rRNA para estimar relações filogenéticas (VANDAMME et al., 1996). Por muitos anos este gene foi utilizado como único marcador genético para avaliação das relações filogenéticas entre estirpes de rizóbio. Entretanto, a ocorrência de estirpes pertencentes a espécies diferentes apresentando 100% de similaridade entre sequências do gene 16S rRNA indicou a necessidade de utilização de outros genes constitutivos para aumentar o poder de discriminação bacteriana para o adequado posicionamento taxonômico das bactérias e de suas relações filogenéticas (GLAESER; KÄMPFER, 2015).

Levando em consideração a limitação do 16S rRNA descrita no parágrafo anterior, uma abordagem relativamente recente vem sendo bastante utilizada por pesquisadores com o intuito de definir com maior clareza informações relacionadas à evolução e filogenia de microorganismos, sendo denominada de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA). É uma metodologia que tem permitido a avaliação conjunta de diversos genes constitutivos em uma única sequência concatenada, possibilitando a descrição em nível de espécie.

Nos últimos anos, estudos com diferentes gêneros rizobianos como *Paraburkholderia* (DALL'AGNOL et al., 2017), *Bradyrhizobium* (GRANADA et al., 2015; GRÖNEMEYER et al., 2016), *Mesorhizobium* (PÉREZ-YÉPEZ et al., 2014), *Ensifer* (CHEN et al., 2017) e

*Rhizobium* (CORDEIRO et al., 2017), tem utilizado a metodologia de MLSA para definir com maior clareza a taxonomia e as relações filogenéticas desses microssimbiontes. Assim, a análise conjunta de genes constitutivos por MLSA, como uma única sequência concatenada, tem sido decisiva na descrição de novas espécies de rizóbios. Espécies como *Bradyrhizobium manausense* (SILVA et al., 2014); *Rhizobium favelukesii* (TEJERIZO et al., 2016) e *Rhizobium altiplani* sp. (BARAÚNA et al., 2016), isoladas de nódulos de *Vigna unguiculata*, *Medicago sativa* L. e *Mimosa pudica*, respectivamente, foram descritas utilizando-se desta ferramenta metodológica.

Após amplificação por PCR e posterior sequenciamento, diversos genes podem ser utilizados em análises por MLSA. Para estudos conduzidos com rizóbios e que fazem uso desta metodologia, segue exemplos de genes com seus respectivos *primers*: 16S rDNA (Y1 - TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC e Y3 - TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991)); *dnaK* (dnaK1466f - AAGGARCANCAGATCCGCATCCA e dnaK1777R - TASATSGCCTSRCCRAGCTTCAT (STEPKOWSKI et al., 2003)); *rpoA* (RRrpoAf - GGAAATCGCCATCAAGATGG e RRrpoAr - GGAAATCGCCATCAAGATGG (RIBEIRO et al., 2009)); *glnII* (TSglnIIIf - AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG e TSglnIIr - SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG (STEPKOWSKI et al., 2005)); *recA* (TSrecAf - CAACTGCMYTGCGTATCGTCAAGG e TSrecAr - CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG (STEPKOWSKI et al., 2005)); *atpD* (TSatpDf - TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG e TSatpDr - CGACACTTCCGARCCSGCCTG (STEPKOWSKI et al., 2005)).

Embora a metodologia de MLSA seja utilizada para descrever novas espécies rizobianas (RADL et al., 2014; GRONEMEYER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2015; GRONEMEYER et al., 2016; COSTA et al., 2017), é importante mencionar que a abordagem da taxonomia polifásica, que possibilita a interação de diversas informações de caráter fenotípico, genético e filogenético, precisa sempre ser lembrada, pois agregam informações valiosas que auxiliam no entendimento da diversidade e evolução desses micro-organismos (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Critério de escolha das áreas, amostragem e caracterização físico-química dos solos

Para a realização de uma amostragem representativa das diferentes condições edafoclimáticas do Semiárido de Pernambuco, alguns critérios foram estabelecidos para a amostragem de solo, tais como: cobertura vegetal e classe de solo. Além disso, buscou-se selecionar classes de solos ocorrentes nas zonas climáticas do Agreste e do Sertão, sendo este último dividido em duas microrregiões (Sertão de Brígida e Terra Nova e Sertão do Pajeú e Moxotó), que apresentam características climáticas e de estrutura e composição da vegetação diferenciadas. Em geral, no Agreste existe uma disponibilidade hídrica maior e mais uniforme ao longo do ano do que no Sertão. Consequentemente, no Agreste a vegetação nativa apresenta maior número de espécies e plantas com maior altura e diâmetro quando comparada com a fitofisionomia do Sertão (PEREIRA et al., 2003; ALCOFORADO FILHO et al., 2003; FERRAZ et al., 2003; FREITAS et al., 2010).

As situações amostrais foram definidas utilizando a base de dados do projeto “Impactos de mudanças climáticas sobre a cobertura e uso da terra em Pernambuco: geração e disponibilização de informações para o subsídio a políticas públicas”, fomentado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Para padronizar a cobertura do solo entre as diferentes áreas amostrais, foi definida a cobertura vegetal aqui denominada de caatinga densa (Figura 1), que consiste na vegetação nativa em estágio menos perturbado, considerando que a vegetação atual do Semiárido apresenta-se como um mosaico de áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a áreas mais preservadas, além de áreas com cultivos. A metodologia adotada para a definição dos polígonos da cobertura vegetal (caatinga densa) baseou-se na interpretação visual de imagens de satélite, envolvendo elementos de reconhecimento (tonalidade, cor e textura), com base em imagens da época chuvosa e época seca, acompanhada por validação em campo. Para diferenciar as áreas de caatinga de outras coberturas do solo, como cultivos e pastagens, foram considerados o tamanho (comprimento, largura, perímetro e área), a forma e o padrão de cada polígono (JENSEN, 2009).



**Figura 1:** Fragmentos de caatinga densa localizados no Semiárido pernambucano

Para o reconhecimento da cobertura vegetal, foram utilizadas as cenas do sensor ccd1xs do satélite CBERS 2B (cena órbita 147 e ponto 110), com data de passagem em 03 de janeiro de 2009, para a imagem da época seca e o sensor LIS3 do satélite IRS P6 ou Resourcesat-1 da Índia (cena órbita 337 e ponto 082), com data de passagem em 04 de março de 2012, para a época chuvosa. Para o sensor ccd1xs (CBERS 2B) foram selecionadas às bandas multiespectrais 2 (520 – 590 nm), 3 (630 – 690 nm) e 4 (770 – 890 nm). Para o sensor LIS3 foram selecionadas as bandas: 1 (520 – 590 nm), 2 (620 – 680 nm) e 3 (770 – 860 nm).

As classes de solo foram determinadas com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco - ZAPE, que contempla, de forma integrada, informações sobre solos, clima e recursos hídricos, considerando-se as manchas dos principais tipos de solos presentes em cada região na escala de 1:100.000 (ARAÚJO FILHO et al., 2000). Diante disso, 7 classes de solo foram selecionadas (4 no primeiro nível categórico (Argissolo, Latossolo, Luvisolo, Planossolo) e 3 no segundo nível categórico (Neossolo litólico, Neossolo quartzarênico e Neossolo regolítico)). Juntas, essas classes cobrem mais de 80 % da área total do estado de Pernambuco (ARAÚJO FILHO et al., 2000).

Para selecionar as áreas amostrais, se fez necessário realizar a sobreposição das imagens da cobertura vegetal com os mapas de tipos de solo. Além disso, buscou-se selecionar áreas preferencialmente em diferentes municípios de forma que elas pudessem ficar relativamente bem distribuídas por todo o Semiárido de Pernambuco (Figura 2). As informações gerais dos municípios encontram-se na Tabela 1. No Agreste, foram selecionadas áreas de Argissolo, Neossolo litólico, Neossolo quartzarênico, Neossolo regolítico e Planossolo. No Sertão de

Brígida e Terra Nova foram selecionadas áreas de Argissolo, Latossolo, Luvissole, Neossolo litólico e Planossolo. No Sertão do Pajeú e Moxotó foram selecionadas áreas de Argissolo, Luvissole, Neossolo litólico, Neossolo quartzarenico e Planossolo. Vale ressaltar que Argissolo, Neossolo Litólico e Planossolo foram as três classes ocorrentes em todas as zonas climáticas estudadas.

Expedições em campo foram necessárias para verificar se a cobertura vegetal ocorrente nas áreas era o mesmo tipo de vegetação selecionado nas imagens, bem como se o local escolhido correspondia ao tipo de solo esperado (conferência com pedólogos). A escolha das áreas amostrais foi feita com o apoio da equipe do Centro de Geoprocessamento da Embrapa Solos - UEP, Recife-PE, e de pedólogos da Embrapa Semiárido e Embrapa Solos - UEP. Os proprietários ou trabalhadores e habitantes das propriedades nos quais os pontos amostrais foram alocados, foram também consultados em relação ao histórico de uso dos locais. Nenhum dos locais selecionados sofreu corte raso ou queima em anos recentes, embora não seja possível precisar o tempo exato em que estavam sem perturbação antrópica. Nos casos em que os locais inicialmente selecionados não corresponderam a esse critério, uma nova área foi escolhida.



**Figura 2:** Distribuição dos pontos de coleta no Semiárido de Pernambuco

**Tabela 1:** Informações gerais dos municípios de coleta distribuídos nas zonas climáticas (ZC) do Agreste e Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

ZC	Municípios	Coordenadas	Altitude (m)	Precipitação média anual (mm)	Temperatura média anual
Agreste	Buíque	8° 36' 51" S / 37° 9' 39" W	846	691,4	21
	Capoeiras	8° 44' 7" S / 36° 37' 38" W	871	673,9	20,5
	Garanhuns	8° 53' 27" S / 36° 29' 48" W	841	873,1	20,4
	Itaíba	8° 56' 54" S / 37° 25' 37" W	465	627,1	22,9
	Pedra	8° 29' 50" S / 36° 56' 28" W	617	687,2	23
	Saloá	8° 57' 5" S / 36° 43' 22" W	943	894,9	21
	Sanharó	8° 21' 35" S / 36° 33' 59" W	661	644,3	24
	S.C. Capibaribe	7° 56' 32" S / 36° 13' 54" W	457	416,2	23,1
	S.B. Uma	8° 31' 20" S / 36° 26' 37" W	619	616,1	23,8
	Tupanatinga	8° 45' 12" S / 37° 20' 27" W	707	735,5	21,6
	Venturosa	8° 34' 33" S / 36° 52' 30" W	549	734,1	23
V. Lério	7° 46' 17" S / 35° 51' 1" W	468	746,5	23,6	
Sertão do Pajeú e Moxotó	Betânia	8° 16' 31" S / 38° 2' 15" W	429	497,2	24,5
	Custódia	8° 4' 55" S / 37° 38' 58" W	531	551,2	22,7
	Iguaracy	7° 50' 21" S / 37° 30' 37" W	565	611,9	22,7
	Inajá	8° 54' 14" S / 37° 49' 44" W	354	487,9	24
	Ingazeira	7° 40' 38" S / 37° 27' 34" W	528	583,7	23
	Itapetim	7° 22' 39" S / 37° 11' 26" W	629	643,9	23,7
	S. Terezinha	7° 22' 43" S / 37° 28' 52" W	796	647,4	22,9
	S.J Belmonte	7° 51' 37" S / 38° 45' 35" W	479	676	23,7
	S.J. Egito	7° 28' 49" S / 37° 16' 26" W	579	516,5	24
	S. Talhada	7° 59' 7" S / 38° 17' 34" W	443	647,5	23,8
	Tacaratu	9° 6' 9" S / 38° 8' 57" W	516	660,5	22,9
Sertão de Brígida e Terra Nova	Afrânio	8° 30' 42" S / 41° 0' 36" W	540	464,3	24,7
	Araripina	7° 34' 41" S / 40° 29' 48" W	621	758,8	23,7
	Bodocó	7° 46' 14" S / 39° 55' 41" W	449	685,7	24,7
	Cabrobó	8° 29' 40" S / 39° 18' 1" W	312	517,3	25,5
	Exú	7° 30' 50" S / 39° 42' 33" W	506	697,2	24,2
	Ipubi	7° 39' 41" S / 40° 8' 37" W	540	756,5	24,4
	Petrolina	9° 23' 39" S / 40° 30' 35" W	380	427,8	24,8
	Salgueiro	8° 4' 3" S / 39° 7' 27" W	421	570,6	24,2
	Santa Cruz	08° 14' 24" S / 40° 20' 05" W	515	502	24,3
	S.M.B. Vista	8° 47' 17" S / 39° 49' 22" W	407	492,9	24,7
	Terra Nova	8° 13' 50" S / 39° 23' 0" W	385	682,6	24,3
Verdejante	7° 55' 7" S / 38° 58' 17" W	475	504,3	23,8	

Para a amostragem, em cada área foram estabelecidas três parcelas com dimensões de 20 x 20 m. Em cada parcela foram coletadas três amostras na camada de 0-20 cm para compor uma amostra composta da parcela. Após a coleta, as amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas a temperatura ambiente pelo menor tempo possível (apenas o tempo necessário para os procedimentos de secagem ao ar, destorroamento, homogeneização, peneiramento (peneira com malha de abertura de 2 mm) e instalação do experimento em casa de vegetação). Subamostras foram separadas para análises físico-químicas.

Os atributos químicos analisados foram: condutividade elétrica (CE) (determinada após preparo da pasta de saturação); pH em água (proporção solo:água de 1:2,5); carbono (C) e nitrogênio (N) totais (determinados pelo método da combustão seca utilizando analisador elementar LECO, TruSpec CHN-900); sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), fósforo (P) (extraídos com Mehlich-1 e dosados por fotometria de emissão de chama ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e colorimetria (P)); cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) (extraídos com  $\text{KCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  e dosados por titulometria); acidez potencial (H+Al) (extraída com acetato de cálcio 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e dosada por titulometria) (Tabela 2). Quanto aos atributos físicos (Tabela 3), determinou-se: granulometria (areia, silte e argila) pelo método da pipeta; densidade do solo ( $D_s$ ), pelo método da proveta; densidade de partículas ( $D_p$ ), pelo método do balão volumétrico. A determinação da granulometria permitiu definir a classe textural de cada ponto amostral. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Solos e Análise de Planta da Embrapa Semiárido, Petrolina, seguindo metodologias estabelecidas por Embrapa (2017).

**Tabela 2:** Caracterização química de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

		(Continua)											
ZC	Solo	Municípios	CE	pH (H <sub>2</sub> O)	C	N	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al
			dS m <sup>-1</sup>		-----g kg <sup>-1</sup> -----		mg dm <sup>-3</sup>	-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----					
Agreste	P	Saloá	0,25 ± 0,01	4,50 ± 0,06	24,27 ± 1,69	1,16 ± 0,15	4,31 ± 0,48	0,12 ± 0,02	0,80 ± 0,15	2,50 ± 0,13	0,07 ± 0,02	1,27 ± 0,13	14,70 ± 1,74
	P	S.B. Una (1)	0,42 ± 0,07	4,90 ± 0,00	14,47 ± 2,68	0,89 ± 0,13	4,57 ± 0,62	0,29 ± 0,03	2,23 ± 0,27	4,43 ± 0,66	0,04 ± 0,01	0,37 ± 0,02	5,60 ± 0,40
	P	S.B. Una (2)	0,45 ± 0,07	5,00 ± 0,06	8,44 ± 0,95	0,59 ± 0,05	5,41 ± 1,42	0,30 ± 0,05	1,63 ± 0,39	5,03 ± 0,83	0,04 ± 0,00	0,28 ± 0,04	4,30 ± 0,29
	RL	V. Lério	0,46 ± 0,07	5,40 ± 0,10	16,70 ± 1,5	1,70 ± 0,05	5,54 ± 1,30	0,40 ± 0,00	4,65 ± 0,65	2,45 ± 0,35	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,05	5,50 ± 1,20
	RL	Itaíba	0,33 ± 0,02	5,57 ± 0,13	14,03 ± 1,13	0,85 ± 0,02	12,71 ± 0,27	0,32 ± 0,06	5,13 ± 0,18	3,37 ± 0,74	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,07	3,50 ± 1,06
	RL	Pedra	0,79 ± 0,56	6,20 ± 0,00	19,23 ± 2,04	1,03 ± 0,05	4,91 ± 0,71	0,35 ± 0,02	9,77 ± 1,04	5,47 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,00 ± 0,00	4,70 ± 0,40
	RQ	Tupanatinga	0,30 ± 0,01	5,23 ± 0,30	8,57 ± 0,88	0,56 ± 0,05	15,35 ± 3,55	0,07 ± 0,00	1,90 ± 0,20	2,70 ± 0,31	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,03	3,90 ± 0,40
	RR	Capoeiras	0,30 ± 0,04	5,00 ± 0,06	7,35 ± 1,58	0,44 ± 0,07	7,33 ± 0,11	0,23 ± 0,02	0,87 ± 0,03	2,52 ± 0,17	0,05 ± 0,01	0,23 ± 0,02	4,70 ± 0,40
	RR	Garanhuns	0,28 ± 0,06	4,70 ± 0,10	8,61 ± 1,07	0,57 ± 0,01	10,03 ± 0,90	0,15 ± 0,01	1,50 ± 0,30	2,20 ± 0,70	0,04 ± 0,00	0,63 ± 0,13	4,90 ± 0,60
	RR	Sanharó	0,41 ± 0,12	4,87 ± 0,03	14,60 ± 1,28	1,20 ± 0,10	8,31 ± 1,48	0,30 ± 0,03	2,37 ± 0,03	4,33 ± 0,58	0,09 ± 0,06	0,17 ± 0,02	8,30 ± 1,60
	S	Buíque	0,22 ± 0,01	5,10 ± 0,20	12,40 ± 2,40	0,94 ± 0,23	11,31 ± 4,05	0,24 ± 0,08	3,85 ± 0,95	2,75 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,00	6,10 ± 0,60
	S	S.B. Una	0,28 ± 0,01	4,23 ± 0,03	7,41 ± 1,13	0,51 ± 0,10	7,12 ± 0,39	0,15 ± 0,02	0,83 ± 0,19	3,03 ± 0,48	0,02 ± 0,00	2,27 ± 0,18	4,70 ± 0,40
S	Venturosa	0,45 ± 0,10	5,33 ± 0,13	20,03 ± 2,08	1,25 ± 0,17	9,57 ± 0,93	0,27 ± 0,03	4,60 ± 0,50	3,47 ± 0,54	0,12 ± 0,03	0,22 ± 0,11	3,90 ± 0,40	
S	S.C. Capibaribe	0,81 ± 0,53	5,83 ± 0,27	9,89 ± 0,97	0,63 ± 0,08	39,09 ± 7,53	0,28 ± 0,03	5,53 ± 0,73	4,37 ± 0,60	0,12 ± 0,05	0,03 ± 0,03	1,90 ± 0,96	
Sertão do Pajeú e Moxotó	P	Custódia	0,27 ± 0,04	5,70 ± 0,00	13,07 ± 0,49	1,16 ± 0,09	3,68 ± 0,16	0,50 ± 0,04	7,97 ± 0,17	4,10 ± 0,42	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,50 ± 0,00
	P	Itapetim	0,39 ± 0,09	5,80 ± 0,15	9,39 ± 0,86	0,82 ± 0,04	11,39 ± 2,47	0,36 ± 0,03	4,40 ± 0,72	3,03 ± 0,34	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00	4,30 ± 0,00
	P	S.J Belmonte	0,32 ± 0,04	5,17 ± 0,09	12,70 ± 0,46	1,23 ± 0,08	2,94 ± 0,94	0,42 ± 0,02	2,40 ± 0,26	3,67 ± 0,26	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,02	7,50 ± 0,40
	RL	S.J. Egito	0,32 ± 0,01	5,50 ± 0,20	8,03 ± 0,04	0,50 ± 0,04	6,56 ± 0,21	0,37 ± 0,03	2,20 ± 0,10	3,37 ± 0,20	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,05	4,30 ± 0,00
	RL	S. Terezinha	0,28 ± 0,01	5,03 ± 0,07	15,70 ± 0,82	1,28 ± 0,04	4,07 ± 0,17	0,39 ± 0,07	2,10 ± 0,06	3,80 ± 0,12	0,03 ± 0,00	0,13 ± 0,03	6,70 ± 0,69
	RQ	Inajá	0,88 ± 0,50	4,63 ± 0,19	5,60 ± 1,00	0,37 ± 0,06	12,97 ± 0,94	0,08 ± 0,00	0,80 ± 0,15	2,90 ± 0,49	0,02 ± 0,00	0,23 ± 0,02	4,70 ± 0,40
	RQ	Tacaratu	0,24 ± 0,02	4,40 ± 0,10	7,64 ± 0,20	0,25 ± 0,04	5,07 ± 1,39	0,04 ± 0,00	0,80 ± 0,10	2,20 ± 0,21	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,12	5,10 ± 0,40
	S	Betânia	0,79 ± 0,56	5,07 ± 0,28	5,99 ± 0,54	0,44 ± 0,16	6,69 ± 0,48	0,26 ± 0,04	2,26 ± 0,23	2,03 ± 0,20	0,02 ± 0,00	0,15 ± 0,00	4,30 ± 0,00
	S	Iguaracy	0,38 ± 0,04	4,97 ± 0,03	10,56 ± 0,92	0,80 ± 0,08	5,75 ± 1,07	0,31 ± 0,03	2,50 ± 0,15	2,37 ± 0,42	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,02	5,50 ± 0,00
	S	Ingazeira	0,32 ± 0,10	4,67 ± 0,03	8,77 ± 0,86	0,38 ± 0,06	5,44 ± 1,15	0,23 ± 0,02	1,93 ± 0,12	2,77 ± 0,19	0,05 ± 0,01	0,28 ± 0,03	8,70 ± 2,00
	T	Custódia	0,29 ± 0,02	5,90 ± 0,06	16,83 ± 1,13	1,13 ± 0,06	7,50 ± 0,46	0,49 ± 0,03	7,23 ± 0,22	4,73 ± 0,20	0,05 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,50 ± 0,40
	T	S.J. Egito	0,25 ± 0,02	5,87 ± 0,03	10,78 ± 0,62	0,77 ± 0,06	3,35 ± 0,52	0,25 ± 0,01	8,17 ± 1,53	6,23 ± 0,79	0,09 ± 0,01	0,00 ± 0,00	4,70 ± 0,40
T	S. Talhada	0,22 ± 0,02	6,40 ± 0,15	9,62 ± 0,35	0,55 ± 0,05	13,24 ± 0,97	0,66 ± 0,02	8,40 ± 0,82	4,70 ± 0,27	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	3,10 ± 0,45	

**Tabela 2:** Caracterização química de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

													(Conclusão)
Sertão de Brígida e Terra Nova	L	Araripina	0,26 ± 0,00	4,40 ± 0,10	8,78 ± 1,22	0,46 ± 0,16	3,59 ± 0,58	0,10 ± 0,02	0,70 ± 0,10	3,25 ± 0,65	0,01 ± 0,00	1,05 ± 0,15	4,30 ± 0,00
	L	Exú	0,33 ± 0,02	4,13 ± 0,06	12,60 ± 1,06	0,80 ± 0,06	8,72 ± 0,46	0,09 ± 0,03	0,47 ± 0,22	2,10 ± 0,20	0,02 ± 0,00	1,03 ± 0,00	10,30 ± 0,40
	L	Santa Cruz	0,34 ± 0,06	5,07 ± 0,28	8,67 ± 0,81	0,54 ± 0,03	4,48 ± 0,51	0,27 ± 0,01	2,47 ± 0,17	2,27 ± 0,23	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,02	3,90 ± 0,40
	P	Bodocó	0,34 ± 0,03	4,50 ± 0,00	11,45 ± 0,05	0,61 ± 0,01	5,82 ± 1,37	0,36 ± 0,02	2,15 ± 0,05	2,35 ± 0,05	0,04 ± 0,00	1,30 ± 0,20	6,10 ± 0,60
	P	Ipubi	1,05 ± 0,39	4,20 ± 0,15	14,40 ± 0,91	0,95 ± 0,05	5,73 ± 1,14	0,15 ± 0,03	2,73 ± 0,29	2,53 ± 0,43	0,04 ± 0,00	0,60 ± 0,03	9,90 ± 0,40
	RL	Afrânio	0,35 ± 0,08	5,87 ± 0,07	26,30 ± 5,1	1,81 ± 0,31	3,04 ± 0,36	0,28 ± 0,04	11,57 ± 0,38	6,67 ± 0,12	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,70 ± 0,40
	RL	Araripina	0,27 ± 0,03	5,67 ± 0,19	9,98 ± 0,21	0,79 ± 0,09	9,61 ± 2,43	0,45 ± 0,01	5,80 ± 0,81	3,83 ± 0,50	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,03	5,10 ± 0,80
	RL	Verdejante	0,26 ± 0,03	5,33 ± 0,09	9,98 ± 1,01	0,60 ± 0,05	3,37 ± 0,42	0,47 ± 0,02	2,43 ± 0,07	4,13 ± 0,44	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,02	5,10 ± 0,40
	S	Salgueiro	0,31 ± 0,06	5,00 ± 0,12	9,66 ± 4,05	0,71 ± 0,22	4,69 ± 0,55	0,29 ± 0,04	2,93 ± 0,09	5,53 ± 0,97	0,04 ± 0,00	0,27 ± 0,07	2,53 ± 0,07
	S	Cabrobó	0,70 ± 0,41	5,47 ± 0,07	8,16 ± 1,69	0,47 ± 0,08	2,72 ± 0,68	0,25 ± 0,04	4,67 ± 0,68	3,58 ± 0,86	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,05	4,30 ± 0,69
	S	Terra Nova	0,77 ± 0,53	4,87 ± 0,20	6,84 ± 0,33	0,79 ± 0,05	4,98 ± 1,39	0,37 ± 0,04	2,93 ± 0,43	3,23 ± 0,12	0,04 ± 0,00	0,27 ± 0,12	5,90 ± 0,40
	T	S.M.B. Vista	0,63 ± 0,10	6,13 ± 0,38	10,76 ± 1,57	0,71 ± 0,15	1,16 ± 0,24	0,21 ± 0,02	7,37 ± 0,62	3,67 ± 0,38	0,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,70 ± 2,12
	T	Petrolina	0,80 ± 0,49	5,13 ± 0,03	4,51 ± 0,47	0,51 ± 0,11	3,47 ± 0,80	0,27 ± 0,01	3,37 ± 0,38	4,50 ± 0,67	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	6,70 ± 2,40

\*P = Argissolo; L = Latossolo; T = Luvisolo; RL = Neossolo Litólico; RQ = Neossolo Quartzarênico; RR = Neossolo Regolítico; S = Planossolo.

X ± Y, onde X = Médias e Y = Erro padrão da média.

**Tabela 3:** Caracterização física e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

(Continua)

ZC	FONTE		Densidade do solo	Densidade de partículas	Granulometria			Classificação textural
	Solo	Municípios			Areia	Silte	Argila	
			-----g cm <sup>-3</sup> -----		-----%-----			
Agreste	*P	Saloá	1,24 ± 0,03	2,45 ± 0,03	68,80 ± 0,41	16,65 ± 0,97	14,55 ± 1,38	Franco-arenosa
	P	S.B. Una (1)	1,34 ± 0,03	2,47 ± 0,02	59,01 ± 2,21	29,58 ± 3,82	11,41 ± 1,63	Franco-arenosa
	P	S.B. Una (2)	1,56 ± 0,01	2,58 ± 0,01	70,69 ± 2,24	19,56 ± 1,39	9,75 ± 0,86	Franco-arenosa
	RL	V. Lério	1,49 ± 0,18	2,67 ± 0,12	72,14 ± 0,29	16,76 ± 0,30	11,10 ± 0,00	Franco-arenosa
	RL	Itaíba	1,42 ± 0,01	2,55 ± 0,04	69,96 ± 2,12	23,39 ± 2,22	6,65 ± 0,88	Franco-arenosa
	RL	Pedra	1,25 ± 0,02	2,42 ± 0,02	70,46 ± 0,23	16,12 ± 1,32	13,42 ± 1,55	Franco-arenosa
	RQ	Tupanatinga	1,66 ± 0,00	2,52 ± 0,08	97,25 ± 0,05	1,20 ± 0,04	1,55 ± 0,06	Arenosa
	RR	Capoeiras	1,5 ± 0,12	2,53 ± 0,03	71,33 ± 1,41	22,62 ± 1,30	6,05 ± 0,54	Franco-arenosa
	RR	Garanhuns	1,62 ± 0,00	2,59 ± 0,04	80,04 ± 0,05	14,70 ± 1,52	5,26 ± 1,46	Areia franca
	RR	Sanharó	1,46 ± 0,03	2,53 ± 0,02	55,11 ± 0,01	22,77 ± 0,23	22,12 ± 0,22	Franco-argilo-arenosa
	S	Buíque	1,49 ± 0,05	2,47 ± 0,01	77,57 ± 0,65	4,17 ± 0,22	18,28 ± 0,42	Franco-arenosa
	S	S.B Una	1,59 ± 0,03	2,59 ± 0,01	75,35 ± 2,46	5,86 ± 0,25	18,79 ± 2,35	Franco-arenosa
	S	Venturosa	1,30 ± 0,03	2,40 ± 0,01	61,75 ± 3,26	26,61 ± 1,50	11,64 ± 1,76	Franco-arenosa
	S	S.C.Capibaribe	1,46 ± 0,01	2,52 ± 0,03	77,14 ± 2,36	16,07 ± 1,65	6,79 ± 0,93	Franco-arenosa
Sertão do Pajeú e Moxotó	P	Custódia	1,37 ± 0,01	2,52 ± 0,01	43,00 ± 0,51	29,42 ± 0,83	27,58 ± 1,34	Franco-argilosa
	P	Itapetim	1,43 ± 0,03	2,50 ± 0,01	79,49 ± 2,01	15,20 ± 1,75	5,31 ± 0,85	Areia franca
	P	S.J.Belmonte	1,25 ± 0,03	2,56 ± 0,01	65,36 ± 1,47	24,75 ± 0,88	9,89 ± 0,60	Franco-arenosa
	RL	S.J. Egito	1,44 ± 0,01	2,53 ± 0,01	49,28 ± 3,81	25,41 ± 2,49	25,31 ± 1,78	Franco-argilo-arenosa
	RL	S. Terezinha	1,19 ± 0,00	2,50 ± 0,04	72,47 ± 3,10	20,75 ± 3,40	6,78 ± 0,69	Franco-arenosa
	RQ	Inajá	1,67 ± 0,01	2,57 ± 0,02	75,81 ± 2,23	17,20 ± 1,48	6,99 ± 0,75	Franco-arenosa
	RQ	Tacaratu	1,66 ± 0,01	2,57 ± 0,02	80,90 ± 0,17	13,70 ± 1,21	5,40 ± 1,12	Areia franca
	S	Betânia	1,57 ± 0,02	2,60 ± 0,00	82,32 ± 1,68	10,07 ± 0,74	7,61 ± 1,21	Areia franca
	S	Iguaracy	1,53 ± 0,01	2,52 ± 0,02	78,08 ± 0,73	15,59 ± 0,53	6,33 ± 0,39	Areia franca
	S	Ingazeira	1,55 ± 0,01	2,52 ± 0,02	64,90 ± 2,5	21,07 ± 1,37	14,03 ± 1,13	Franco-arenosa
	T	Custódia	1,28 ± 0,01	2,46 ± 0,02	63,82 ± 0,60	26,50 ± 0,78	9,68 ± 0,80	Franco-arenosa
T	S.J. Egito	1,28 ± 0,02	2,54 ± 0,01	58,36 ± 0,52	21,84 ± 0,98	19,80 ± 0,45	Franco-argilo-arenosa	
T	S. Talhada	1,45 ± 0,02	2,62 ± 0,02	86,20 ± 3,10	8,60 ± 1,65	5,20 ± 1,27	Areia franca	

**Tabela 3:** Caracterização física e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas sob vegetação de caatinga densa em diferentes zonas climáticas (ZC) do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

								(Conclusão)
Sertão de Brígida e Terra Nova	L	Araripina	1,40 ± 0,01	2,55 ± 0,04	72,26 ± 0,46	13,45 ± 0,18	14,29 ± 0,28	Franco-arenosa
	L	Exú	1,42 ± 0,00	2,55 ± 0,01	70,34 ± 0,85	18,44 ± 0,52	11,21 ± 1,37	Franco-arenosa
	L	Santa Cruz	1,52 ± 0,03	2,59 ± 0,02	81,76 ± 0,64	10,00 ± 0,46	8,24 ± 0,73	Areia franca
Sertão de Brígida e Terra Nova	P	Bodocó	1,43 ± 0,01	2,50 ± 0,00	59,29 ± 1,13	26,16 ± 0,45	14,54 ± 0,69	Franco-arenosa
	P	Ipubi	1,31 ± 0,00	2,49 ± 0,01	61,11 ± 1,60	16,55 ± 1,11	22,34 ± 1,72	Franco-argilo-arenosa
	RL	Afrânio	1,24 ± 0,02	2,49 ± 0,03	68,82 ± 0,47	23,86 ± 0,84	7,34 ± 0,40	Franco-arenosa
	RL	Araripina	1,42 ± 0,01	2,54 ± 0,01	73,57 ± 5,18	17,13 ± 3,51	9,30 ± 1,9	Franco-arenosa
	RL	Verdejante	1,35 ± 0,02	2,56 ± 0,01	48,10 ± 5,16	24,95 ± 3,22	26,95 ± 3,49	Franco-argilo-arenosa
	Sertão de Brígida e Terra Nova	S	Salgueiro	1,49 ± 0,04	2,52 ± 0,01	62,99 ± 0,37	30,33 ± 0,33	6,68 ± 0,66
S		Cabrobó	1,37 ± 0,01	2,42 ± 0,07	77,07 ± 0,90	15,48 ± 0,57	7,45 ± 0,44	Franco-arenosa
S		Terra Nova	1,41 ± 0,04	2,53 ± 0,03	53,84 ± 0,38	28,82 ± 0,28	17,34 ± 0,30	Franco-arenosa
T		S.M.B Vista	1,38 ± 0,03	2,50 ± 0,01	66,30 ± 1,37	19,07 ± 0,56	14,63 ± 1,04	Franco-arenosa
T		Petrolina	1,56 ± 0,03	2,58 ± 0,01	71,76 ± 1,90	20,83 ± 2,01	7,41 ± 1,19	Franco-arenosa

\*P = Argissolo; L = Latossolo; T = Luvisolo; RL = Neossolo Litólico; RQ = Neossolo Quartzarênico; RR = Neossolo Regolítico; S = Planossolo.

X ± Y, onde X = Médias e Y = Erro padrão da média.

### 3.2 Experimento com planta-isca para a obtenção dos nódulos radiculares

As comunidades rizobianas foram acessadas em ensaio de crescimento de planta-isca em casa de vegetação, utilizando vasos de polietileno. Cada amostra composta da parcela correspondeu a uma repetição do experimento em casa de vegetação. A espécie *Vigna unguiculata* L. (Walp) (feijão-caupi) foi utilizada como planta-isca (Figura 3). Essa espécie foi escolhida por sua conhecida habilidade de estabelecer simbiose com comunidades de alfa e beta-rizóbios. A variedade de feijão-caupi utilizada foi a BRS Pujante, com sementes obtidas do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Antecedendo a semeadura, realizou-se a desinfestação superficial das sementes utilizando álcool etílico (98 %) por 3 minutos e hipoclorito de sódio (1 %) por 3 minutos (COSTA et al., 2014b), com dez lavagens sucessivas em água destilada estéril (ADE) para remover o resíduo do hipoclorito de sódio.



**Figura 3:** Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados com 40 tratamentos, correspondentes aos pontos amostrais já descritos (Tabela 3) e três repetições. Quatro sementes foram semeadas por vaso. O desbaste foi realizado 15 dias após o plantio, deixando-se uma planta por vaso. A coleta das plantas foi realizada aos 50 dias após o plantio.

Na ocasião da coleta, as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas. Os nódulos foram destacados, contados e acondicionados em recipientes contendo sílica gel para preservação, obtenção da biomassa seca em sílica e posterior isolamento das bactérias. As raízes

e a parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h, sendo posteriormente pesadas. Além das variáveis citadas, determinou-se o teor de nitrogênio total (NT) por digestão sulfúrica e posterior destilação pelo método do semimicro Kjeldahl (LIAO, 1981) no Laboratório de Energia da Biomassa do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE.

### **3.3 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos**

Cinco nódulos foram amostrados aleatoriamente para cada unidade experimental e reidratados em água destilada estéril (ADE) por 60 minutos. Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente por imersão em álcool etílico (98 %) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (2,5 %) por 5 minutos, com lavagens sucessivas em ADE. Com auxílio de uma pinça, os nódulos foram pressionados em placa de Petri com meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA, pH 6.8) com adição do corante vermelho Congo (VINCENT, 1970). Antes do esmagamento, os nódulos foram rolados em uma parte da placa para verificar a eficiência do processo de desinfestação. Após o isolamento, as placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C até o aparecimento das colônias bacterianas. Após o aparecimento das colônias, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH, e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente sendo o aparecimento das colônias monitorado diariamente. Após o aparecimento de colônias típicas de rizóbio, as mesmas foram avaliadas e purificadas por meio de sucessivas inoculações no mesmo meio.

Com os isolados já purificados, realizou-se a caracterização fenotípica conforme Martins et al. (1997), avaliando: reação de pH em meio de cultura (ácido (AC), alcalino (AL) ou neutro (N)); tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas aparecem até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias aparecem de quatro a seis dias; e lento – colônias aparecem depois de seis dias); tamanho da colônia (puntiforme - colônias com diâmetro menor que 1 mm; colônias com diâmetro entre 1-2 mm e colônias com diâmetro >2 mm); forma da colônia (circular ou irregular); aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); transparência da colônia (opaca - quando não permite a passagem da luz através da placa; translúcida - quando permite a passagem da luz através da placa, mas sem muita nitidez; e transparente – percebe-se claramente o que tem do outro lado); cor das colônias (branca, amarela, creme e rósea); presença de muco (sim ou não); quantidade de muco (muito ou pouco); elevação (muito elevada, levemente elevada, sem elevação) e tipo de muco (viscoso, butírico ou floculoso). Depois de

caracterizados, os isolados, devidamente identificados, foram estocados em tubos de polipropileno (com capacidade para 2 mL) contendo 1,5 mL de meio YM (extrato de levedura e manitol) com glicerina (25 %) e armazenados em freezer a -20° C.

### **3.4 Caracterização genotípica**

Todas as etapas envolvendo a caracterização molecular (extração de DNA, amplificação de genes, análise de restrição e purificação) foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo (LMS) da Embrapa Semiárido, Petrolina. Todos os isolados estocados foram colocados para crescer em meio YMA para a verificação da pureza.

#### **3.4.1 Extração de DNA**

Para todos os isolados, o DNA foi extraído por lise alcalina seguindo metodologia descrita por Wang et al. (1993), com modificações. Neste método de extração, as bactérias foram colocadas para crescer em meio YM conforme o tempo de crescimento de cada isolado. Centrifugou-se 1,0 mL da suspensão de células a 10.000 g por três minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1,0 mL de água ultra-pura esterilizada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, com a última centrifugação sendo realizada por um tempo de 5 minutos. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 500 µL de NaOH (0,5 mol) e deixado em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 30 µL do material lisado foi coletado e diluído em 470 µL de solução de Tris-HCl (20 mM, pH 8,0). O volume final de 500 µL correspondeu ao DNA extraído que foi armazenado a -20° C.

#### **3.4.2 Amplificação de fragmentos do gene simbiótico *nodC***

A primeira triagem estabelecida como critério de seleção dos isolados rizobianos foi a amplificação de fragmentos do gene simbiótico *nodC*. Para isso, pares de iniciadores descritos para a amplificação de fragmentos do gene *nodC* de alfa e beta-rizóbios foram utilizados. Os pares de iniciadores utilizados foram: NodCforBurk (GAYATGGARTAYTGGYT) e NodCrevBurk (CTCAATGTACACARNGCRTA) (ELLIOTT et al., 2007) para amplificar o fragmento de aproximadamente 460 pares de bases (pb) de bactérias do grupo dos beta-rizóbios e NodCfor540 (TGATYGAYATGGARTAYTGGCT) e NodCrev1160

(CGYGACARCCARTCGCTRRTTG) (SARITA et al., 2005) para amplificar o fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb) de bactérias do grupo dos alfa-rizóbios.

As reações foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo: tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, dNTP 1,0 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U, iniciadores (0,75 µM) e 4 µL de DNA. A amplificação ocorreu em termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems, EUA) com uma etapa de desnaturação inicial (94 °C por 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento (55 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 1 min), e extensão final a 72 °C por 5 min. Do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma alíquota de 2 µL de cada reação foi corada com 2 µL de azul de bromofenol contendo o agente intercalante GelRed (Biotium) e submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose (1,0 %) a 100 V por 90 minutos, em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0,5X.

O tamanho dos fragmentos foi determinado utilizando o marcador molecular 100 pb DNA Ladder (DNA Express). Os géis foram documentados em fotodocumentador LPix-STi usando o programa “L-Pix Imagem 2.7” (Loccus Biotecnologia).

### 3.4.3 Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA

Para todos os isolados *nodC* positivo, avaliou-se a diversidade genética utilizando a técnica da Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA). Para tal, amplificou-se o gene 16S rRNA com os iniciadores universais Y1 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) e Y3 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC), (YOUNG et al., 1991). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 30 µL, contendo: tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,5 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U, iniciadores (0,20 µM) e 7,6 µL de DNA. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial (94 °C por 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento (57 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 2 min), e extensão final a 72 °C por 7 min. O tamanho dos fragmentos foi determinado utilizando o marcador molecular 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Os produtos de PCR foram tratados e visualizados da mesma forma conforme descrito para o *nodC*.

Os sítios de corte das enzimas de restrição *HaeIII*, *MspI* e *Hin6I* estão apresentados na Tabela 4. As digestões com as endonucleases ocorreram *overnight* a 37 °C em um volume final de 10 µL, contendo: tampão de reação 1X, endonucleases 5 U e 5 µL do produto da PCR. Para as enzimas cujo tampão de reação não continha albumina do soro bovino (BSA), esta foi introduzida separadamente (2 µL/reação). Os produtos da digestão foram submetidos a

eletroforese horizontal em gel de agarose (1,0 %) a 100 V por 120 minutos, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. Para verificar o tamanho dos fragmentos, utilizou-se nas laterais dos géis, o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (DNA Express). Ao final da eletroforese, os géis foram documentados em fotodocumentador LPix-STi conforme descrito acima. As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths), utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

**Tabela 4:** Sítios de corte das enzimas utilizadas na Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

ENZIMAS	FONTE	SÍTIOS DE CORTE
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' – GG <sup>^</sup> CC – 3'
		3' – CC <sup>^</sup> GG – 5'
<i>MspI</i>	<i>Moraxella</i> sp.	5' – C <sup>^</sup> CGG – 3'
		3' – GGC <sup>^</sup> C – 5'
<i>Hin6I</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> RFL6	5' – G <sup>^</sup> CGC – 3'
		3' – CGC <sup>^</sup> G – 5'

Além dos isolados *nodC* positivo, aplicou-se também a técnica de ARDRA a 17 estirpes de referência, a saber: *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571T); *Bradyrhizobium* sp. (BR1436); *B. japonicum* (USDA 06T); *B. neotropica* (BR10247T); *B. elkanii* (BR2811T); *Ensifer* sp. (USDA 192); *E. saheli*. (ATCC 51690T); *Microvirga zambiensis* (HIAMBI 3238T); *Ochrobactrum lupini* (DSM 16930<sup>T</sup>); *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (LMG 8820T); *R. etli* (CFN 42T); *Paraburkholderia sabiae* (BR3407<sup>T</sup>); *P. tuberum* (STM 678<sup>T</sup>); *P. phymatum* (STM 815<sup>T</sup>); *P. nodosa* (BR3437<sup>T</sup>); *P. mimosarum* (BR10610<sup>T</sup>) e *Cupriavidus taiwannensis* (BR3471<sup>T</sup>).

A partir da análise do dendrograma de similaridade gerado pela análise dos perfis de ARDRA, foi determinado um “threshold” de 75 % de similaridade de acordo com o coeficiente de Jaccard para selecionar representantes dos grupos.

### 3.4.4 Sequenciamento parcial de genes constitutivos e simbiótico

A avaliação das relações filogenéticas dos isolados rizobianos foi realizada por meio do sequenciamento dos genes constitutivos 16S rRNA, *recA* e *gyrB*, além do gene simbiótico *nodC*.

O gene 16S rRNA foi o primeiro a ser sequenciado a fim de realizar o agrupamento e seleção dos isolados rizobianos para serem submetidos ao sequenciamento dos demais genes.

Para amplificar o gene 16S rRNA foram utilizadas as mesmas condições e iniciadores descritos anteriormente no tópico de análise de restrição. Para os genes *recA* e *gyrB* utilizou-se, respectivamente, os seguintes pares de iniciadores: TSrecAF (CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG) e TSrecAR (CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG) (STEPKOWSKI et al., 2005) para amplificar o fragmento de aproximadamente 580 pb; *gyrB*<sub>B343F</sub> (TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG) e *gyrB*<sub>B1043R</sub> (AGCTTGTCCTTSGTCTGCG) (MARTENS et al., 2008) para amplificar o fragmento de aproximadamente 580 pb. Visando amplificar os fragmentos dos genes *recA* e *gyrB* de *Paraburkhloderia*, utilizou-se os seguintes pares de iniciadoras: *recA*-BurkF (AGGACGATTCATGGAAGAWAGC) e *recA*-BurkR (GACGCACYGAYGMRTAGAACTT) (SPILKER et al., 2009) para amplificar o fragmento de aproximadamente 416 pb; *gyrB*-BurkF (ACCGGTCTGCAYCACCTCGT) e *gyrB*-BurkR (YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC) (SPILKER et al., 2009) para amplificar o fragmento de aproximadamente 583 pb.

Para ambos os genes (*recA* e *gyrB*), independente dos pares de iniciadores, as reações foram dimensionadas para um volume final de 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 7,6 µL de DNA. Quanto às condições de amplificação no termociclador, o equipamento foi programado da seguinte forma: **TSrecA** - desnaturação inicial (95 °C por 2 min), 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 45 segundos), anelamento (58 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 1,5 min), e extensão final a 72 °C por 7 min; **recA-Burk** - desnaturação inicial (95 °C por 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30s), anelamento (58 °C por 30s) e extensão (72 °C por 45s), e extensão final a 72 °C por 7 min; **gyrB343** - desnaturação inicial (95 °C por 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 min), anelamento (58 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 1 min), e extensão final a 72 °C por 5 min; **gyrB-Burk** - desnaturação inicial (95 °C por 2 min), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento (58 °C por 30s) e extensão (72 °C por 1 min), e extensão final 72 °C por 5 min.

Os pares de iniciadores e as condições de amplificação do gene simbiótico *nodC* foram descritas anteriormente durante a primeira triagem estabelecida como critério de seleção dos isolados rizobianos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial de purificação GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), liofilizados e enviados para serem sequenciados na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul).

Após a obtenção das sequências, a avaliação da qualidade foi realizada utilizando o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) a fim de verificar a similaridade com as sequências de estirpes tipo (type strain) utilizando-se a ferramenta “basic local alignment tool”, algoritmo Blastn (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências das estirpes tipo e dos isolados rizobianos com maior similaridade foram baixadas para o alinhamento e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. O método Neighbour-Joining e o modelo Jukes-Cantor foram utilizadas para a elaboração das árvores filogenéticas com auxílio do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

### **3.5 Testes bioquímicos**

Previamente, os isolados foram crescidos em meio YMA para a verificação da pureza e, posteriormente, repicados em meio YM onde foram submetidos à agitação constante em mesa agitadora a 120 rpm a temperatura ambiente, conforme o tempo de crescimento de cada isolado. Com isso, em todos os testes, para cada isolado, utilizou-se o mesmo pré-inóculo.

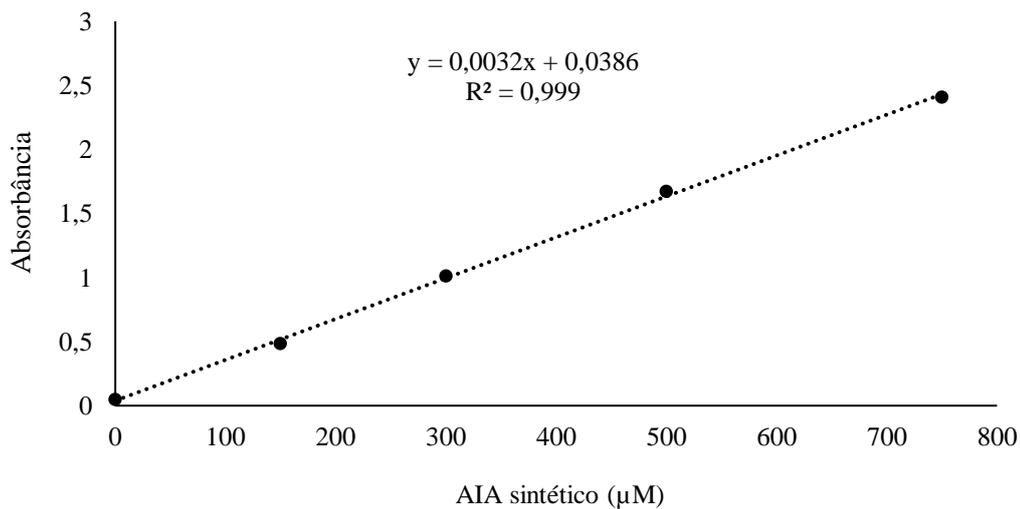
#### **3.5.1 Produção de AIA**

A quantificação de auxinas foi realizada adotando o método colorimétrico desenvolvido por Sarwar e Kremer (1995), com adaptações. Em tubos de centrifugação tipo Falcon (15 mL), contendo 3 mL de meio YM enriquecido com L-triptofano ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  do pré-inóculo de cada isolado, além da estirpe referência (BR3267) e a um controle negativo (apenas com o meio YM enriquecido com L-triptofano) para verificar possíveis contaminações. Antes de adicionar o pré-inóculo ao meio enriquecido com L-triptofano, avaliou-se em espectrofotômetro (540 nm) a densidade ótica (DO) de cada isolado afim de ajustar para uma absorbância de 0.5, a qual, na escala de Mc Farland, corresponde a uma concentração de células de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (ufc)  $\text{mL}^{-1}$ . As avaliações foram realizadas em triplicata e os tubos submetidos à agitação constante em mesa agitadora a 120 rpm conforme o tempo de crescimento de cada isolado.

Após ser verificado o crescimento rizobiano, os tubos foram submetidos à centrifugação (6000 g por 5 minutos). Para a estimativa da produção do AIA,  $150 \mu\text{L}$  do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para poços de microplacas de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) onde, em seguida, foram adicionados  $150 \mu\text{L}$  do reagente Salkowski. A reação

colorimétrica ocorreu em temperatura ambiente durante 30 minutos no escuro. Os isolados capazes de produzir AIA proporcionaram o surgimento da cor rósea durante a reação (mais intensa para os isolados com maior capacidade de produção de AIA). A intensidade da coloração foi avaliada em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 530 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (Multiskan GO, Thermo-Scientific).

Para a estimativa da produção de AIA, os dados de absorbância foram interpolados em uma curva de calibração. Concentrações conhecidas de AIA sintético foram utilizadas para a elaboração da curva, a saber: 0, 150, 300, 500 e 750  $\mu\text{M}$  (Figura 4).



**Figura 4:** Curva de calibração de AIA utilizada para quantificar, a partir da absorbância, o AIA produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa

Todas as soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito a seguir:

- ✓ **Solução de L-triptofano:** Para o preparo da solução estoque de L-triptofano (10  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), realizou-se a diluição de 1 g de L-triptofano em 100 mL de água destilada. Gotas de KOH (1M) foram sendo adicionadas afim de proporcionar a completa dissolução do L-triptofano. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro de seringa com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenada em frasco âmbar. Para o enriquecimento do meio YM com L-triptofano (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) adicionou-se 1 mL da solução estoque de L-triptofano para cada 99 mL de meio de cultura esterilizado.
- ✓ **Solução estoque de AIA sintético (Vetec):** foi preparada uma solução de 10 mM (1,75  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) de AIA em água destilada, adicionando-se aos poucos KOH (1M).

- ✓ **Reagente de Salkowski** (GORDON; WEBER, 1951): uma alíquota de 1 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5M (1,35 g/10 mL) foi adicionada a 49 mL de  $\text{HClO}_4$  (35 %).
- ✓ **Curva de calibração de AIA:** A partir da solução de 10 mM de AIA sintético, foram preparadas soluções estoque para cada ponto da curva com volume final de 40 mL. Para os pontos 1, 2 3 e 4, foram pipetadas alíquotas de 0,6; 1,2; 2,0 e 3,0 mL da solução de AIA sintético em tubos contendo 39,4; 38,8; 38 e 37 mL de água destilada. Para o ponto zero (0) (sem AIA sintético), utilizou-se água destilada. A reação colorimétrica da curva ocorreu a partir da utilização de alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque e 150  $\mu\text{L}$  da solução de Salkowski. O tempo de reação da curva bem como a avaliação da intensidade da coloração (Figura 5) ocorreram da mesma forma conforme descrito anteriormente. Os dados de absorbância foram plotados em um gráfico de dispersão (X, Y) utilizando o MICROSOFT OFFICE EXCEL, 2013.

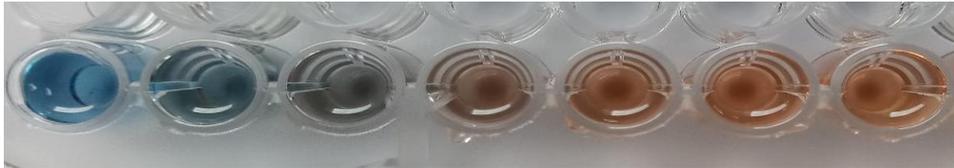


**Figura 5:** Reação colorimétrica da curva de calibração de AIA sintético utilizada para quantificar o AIA produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa

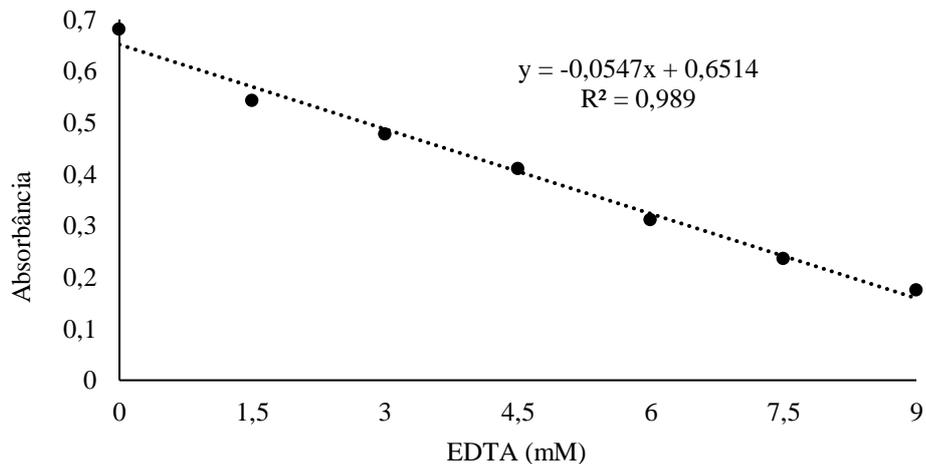
### 3.5.2 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada utilizando o método quantitativo da microplaca descrito por Arora e Verma (2017), com modificações. Para isso, 1 mL do pré-inóculo de cada isolado foi centrifugado a 9.500 g por 5 minutos. A estirpe referência BR6267 e a amostra branca (apenas com o meio YM para verificar possíveis contaminações) também foram submetidas a este procedimento. Do sobrenadante, 150  $\mu\text{L}$  foram transferidos para poços de microplacas de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) contendo 150  $\mu\text{L}$  do corante cromoazurol S (CAS). Após a adição do sobrenadante e do CAS, armazenou-se a placa no escuro durante 30 minutos (tempo necessário para ocorrer a reação colorimétrica). Isolados capazes de converter a cor azul da solução de CAS para amarelo, dentro de 30 minutos, foram considerados positivos para a produção de sideróforos. O CAS é um complexo (corante-ferro) que, quando um ligante forte sequestra e complexa o Fe, o corante é liberado, causando, portanto, a mudança de cor do azul para o amarelo.

Tanto a intensidade da coloração das amostras quanto da curva (Figura 6) foram avaliadas em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 630 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (Multiskan GO, Thermo-Scientific). A partir dos valores de absorbância, realizou-se a interpolação dos dados em uma curva de calibração para estimar a produção de sideróforos. A curva foi construída com concentrações conhecidas de EDTA (sequestrante de ferro): 0; 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 e 9 mM (Figura 7). Os resultados foram expressos em mM equivalente de EDTA.



**Figura 6:** Reação colorimétrica da curva de calibração de sideróforos utilizada para quantificar os sideróforos produzidos por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa



**Figura 7:** Curva de calibração de sideróforos utilizada para quantificar, a partir da absorbância, os sideróforos produzidos por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa

A solução indicadora de CAS foi preparada em balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 6 mL da solução de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – HDTMA (10 mM) e um pouco de H<sub>2</sub>O; 1,5 da solução férrica (FeCl<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O 1 mM) preparada em HCl 0,01 N e 7,5 mL da solução aquosa de CAS (2 mM). Separadamente foi dissolvido 4,307 g de piperazina anidra em aproximadamente 20 mL de H<sub>2</sub>O, adicionando-se, posteriormente, 6,25 mL de

HCl<sub>conc.</sub>. Após preparada, esta solução tampão (pH=5,6) foi então transferida para o balão volumétrico e o volume completado para 100 mL com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

### 3.5.3 Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>)

A capacidade de solubilizar fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>) pelos isolados foi verificada utilizando o meio de cultura GL (10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de Agar por litro de meio) desenvolvido por Sylvester-Bradley et al. (1982). A este meio foram adicionadas as soluções **A** (5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 50 mL de água) e **B** (10g de CaCl<sub>2</sub> em 100 mL de água), ajustando-se o pH para 6.5 afim de formar o CaHPO<sub>4</sub> (HARA; OLIVEIRA, 2004). Após fundido com os elementos responsáveis pela formação do precipitado insolúvel de CaHPO<sub>4</sub>, o meio foi vertido em placas de Petri.

A partir do pré-inóculo de cada isolado, dez microlitros foram inoculados nas placas contendo o meio GL. A capacidade de solubilização foi verificada através da presença de um halo translúcido ao redor da colônia. Os testes foram realizados em triplicata. O Índice de solubilização (IS) =  $\emptyset$  Halo (mm) /  $\emptyset$  Colônia (mm) (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976) foi determinado no décimo dia de crescimento dos isolados no meio GL. As medidas dos diâmetros foram realizadas utilizando um paquímetro digital. Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como isolados com baixa (IS < 2), média (2 < IS < 4) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização.

### 3.5.4 Capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono

A capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono (C) foi avaliada com os pré-inóculos ajustados para uma DO de 0.1 em espectrofotômetro (540 nm). Dez fontes de carbono foram utilizadas: ácido maléico, amido, arabinose, carboximetilcelulose (CMC), cellobiose, frutose, glicose, xilose, maltose e manitol. A avaliação foi realizada em triplicata, com as fontes de carbono na concentração de 1 %. Embora o meio de cultivo inicial dos isolados tenha sido o YMA (que tem como fonte de carbono o manitol), esta fonte foi utilizada novamente como controle positivo.

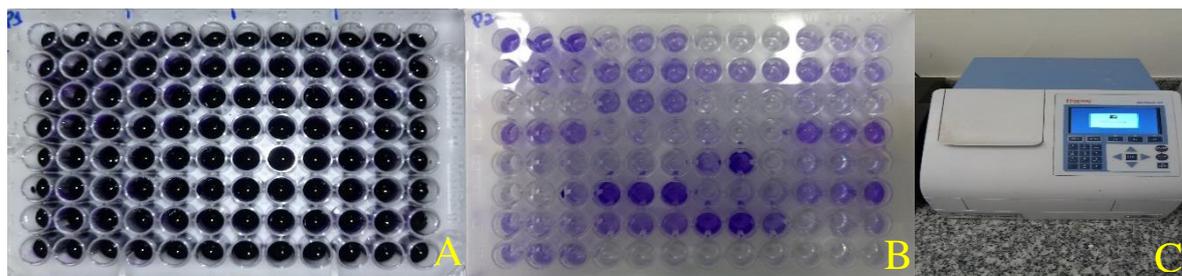
Em poços de microplacas de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) foram adicionados 5 µl do pré-inóculo com a DO ajustada e 145 µl de meio com as diferentes fontes de carbono. Em temperatura ambiente, os isolados foram colocados para crescer de forma estática (sem agitação). Após o tempo de crescimento de cada isolado, realizou-se as leituras

em espectrofotômetro a 530 nm. Para cada fonte de carbono, colocou-se uma amostra branca (apenas com o meio de cultura) para verificar possíveis contaminações. Naturalmente, os 5 µl de cada isolado que foram adicionados aos poços, causam uma certa turbidez. Assim, visando realizar esta correção, antes de serem feitas as leituras em espectrofotômetro, ajustou-se novamente a DO de um isolado qualquer para 0.1. Uma alíquota de 5 µl desse isolado foi então transferida para os controles negativos de cada fonte afim de corrigir a turbidez natural causada pelos 5 µl de cada isolado adicionado. Os isolados capazes de utilizar as fontes de carbono aqui citadas, turvaram o meio de cultura, proporcionando uma absorbância superior a absorbância verificada nas amostras brancas.

### **3.5.5 Produção de biofilme**

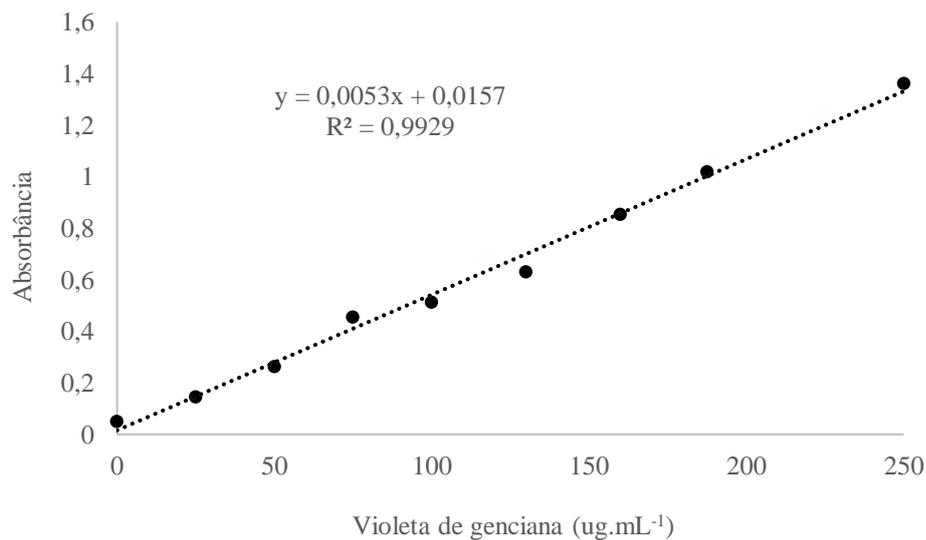
A partir do pré-inóculo de cada isolado, ajustou-se a DO para uma absorbância de 0.1 em espectrofotômetro (540 nm). Após o ajuste, 5 µL do caldo de cultivo foram transferidos para cada poço da microplaca de poliestireno (microplacas de Elisa com 96 poços) suplementado com 195 µL de meio YM. Os isolados foram colocados para crescer em triplicata, de forma estática (sem agitação) e em temperatura ambiente. Além dos 60 isolados, foram reservados 3 poços para o cultivo da BR3267 (estirpe referência) e 3 poços para a controle negativo (apenas com o meio YM) para verificar possíveis contaminações.

Após o tempo de crescimento de cada isolado, descartou-se o conteúdo da placa e três lavagens foram realizadas adicionando 200 µL de ADE em cada poço. Posteriormente às lavagens, em temperatura ambiente, as placas foram colocadas para secar por 20 minutos. Nos poços secos, adicionou-se 100 µL de Violeta de Genciana (0,25 %) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas conforme descrito anteriormente e 200 µL da solução álcool-acetona (proporção 80:20) foi adicionada em cada poço. Para os isolados capazes de produzir biofilme, foi possível verificar nos poços a cor roxo-azulada, a qual foi submetida à leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Figura 8).



**Figura 8:** Produção de biofilme por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa. Adição de violeta de genciana (0,25 %) (A); Adição da solução álcool-acetona (proporção 80:20) (B); espectrofotômetro utilizado para estimar a formação de biofilme (C)

Diluições de violeta de genciana (0,25 %) em solução álcool-acetona (proporção 80:20) foram realizadas nas concentrações de 0; 25; 50; 75; 100; 130; 160; 187,5 e 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 9) afim de construir a curva de calibração para estimar a produção de biofilme. A avaliação da formação de biofilme foi realizada seguindo metodologia descrita por Merino et al. (2009), com modificações.

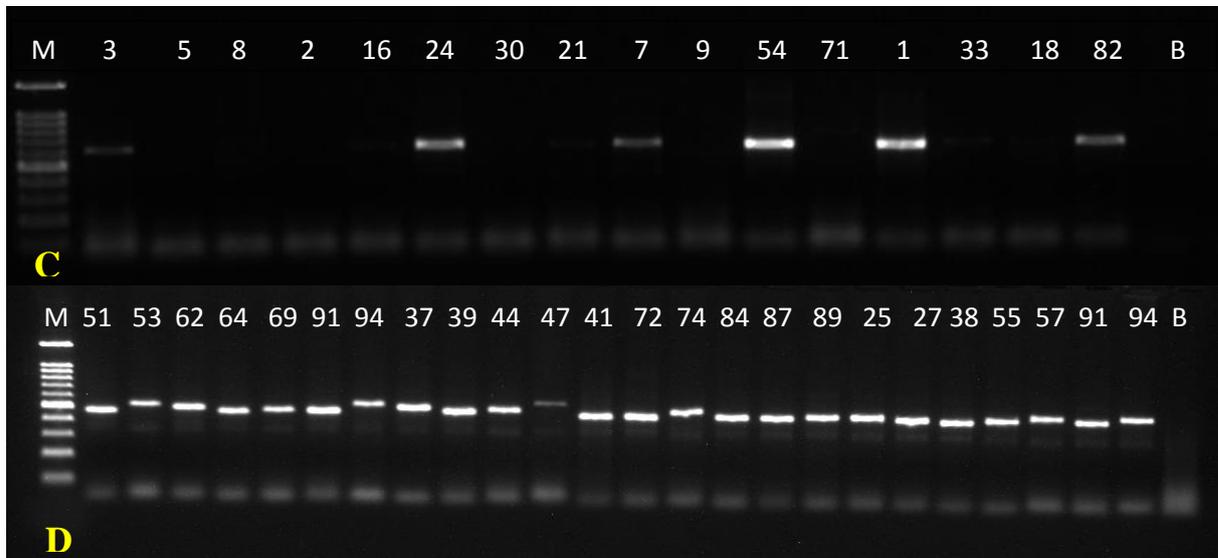


**Figura 9:** Curva de calibração de biofilme utilizada para quantificar, a partir da absorbância, o biofilme produzido por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação do gene *nodC*

Dos nódulos coletados no experimento de planta-isca foram obtidos 434 isolados de nódulos de feijão-caupi. Por ser o marcador simbiótico mais utilizado em estudos de diversidade e evolução envolvendo genes de nodulação (MEYER et al., 2016; SANTOS et al., 2017; TAMPKAKI et al., 2017; COSTA et al., 2017), todos os isolados foram submetidos à amplificação do gene *nodC* (Figura 10), sendo a primeira triagem realizada como critério de seleção. Dos 434 isolados, 338 foram positivos (*nodC*+) para a amplificação desse fragmento. Desse total de *nodC*+, 72 foram obtidos de Argissolo, 29 de Latossolo, 70 de Luvisolo, 76 de Neossolo Litólico, 8 de Neossolo Quartzarênico, 7 de Neossolo Regolítico e 76 de Planossolo.



**Figura 10:** Amplificação do fragmento do gene simbiótico *nodC* em isolados de nódulos de feijão-caupi: **C** - fragmento amplificado utilizando os primers NodCfor540 e NodCrev1160 para alfa-rizóbios e, **D** - fragmento amplificado utilizando os primers NodCforBurk e NodCrevBurk para beta-rizóbios. Os números correspondem aos isolados selecionados aleatoriamente, e o B ao controle negativo. O marcador molecular (M) utilizado em C e D foi o de 100pb DNA ladder

O insucesso da amplificação do gene *nodC* em 22,6 % dos isolados avaliados pode estar relacionado há alguns fatores: Pode decorrer do isolamento de bactérias não rizobianas que, conseqüentemente, não têm este gene. Alguns estudos têm demonstrado que no interior do nódulo também existem outros micro-organismos não nodulantes (COSTA et al., 2013; Dhole et al., 2016, LEITE et al., 2018); pode existir divergências nos genes *nod* dos isolados (ESTRELLA et al., 2009) ou mesmo os oligonucleotídeos utilizados na amplificação podem não anelar nos *loci* do gene *nodC* das bactérias (LAGUERRE et al., 2001). No presente estudo,

por exemplo, ficou comprovado que ambos os primers utilizados para amplificar o fragmento do gene *nodC* (*nodCburk* e *nodCalfa*), amplificam tanto o fragmento de alfa quanto de beta-rizóbios, porém, verificou-se que o primer *nodCburk* é menos específico do que o primer *nodCalfa*.

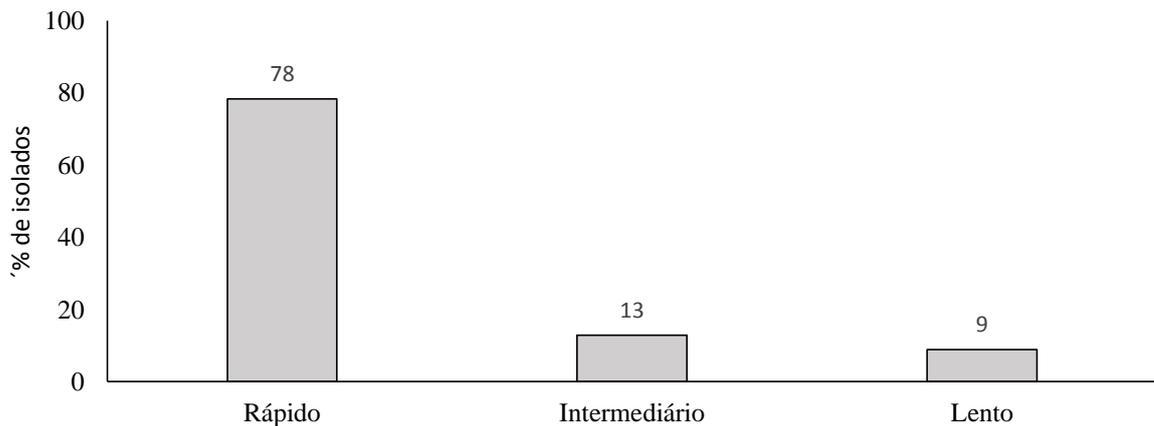
Embora existam essas limitações, o uso da amplificação do gene *nodC* tornou-se uma ferramenta de grande importância na seleção de rizóbios. Tem sido uma prática que tanto pode reduzir o tamanho, quanto dispensar a necessidade de um experimento de autenticação no hospedeiro de origem (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013; MOTHAPO et al., 2013; SANTOS, 2017; RODRIGUES et al., 2018). Ao se aplicar a abordagem com a utilização de mais de um par de iniciadores para *loci* distintos do *nodC* a probabilidade de não se amplificar o gene alvo é muito reduzida, conforme demonstrado recentemente por Silva et al. (2019) que desenvolveram uma abordagem simples de duplex PCR para a amplificação de genes simbióticos e utilizaram nas reações os dois pares de iniciadores usados no presente estudo. Os autores verificaram amplificação positiva em diversos rizóbios, tanto alfa como beta-rizóbios, indicando a abordagem como eficaz na seleção preliminar de bactérias rizobianas, tanto em reações de duplex como simplex PCR. No presente estudo observamos resultados positivos para a presença do gene *nodC* em 77,4 % das bactérias avaliadas, superior a estudos recentes utilizando a abordagem clássica de autenticação de rizóbios para feijão-caupi (MOHAMMED; JAISWAL; DAKORA, 2018), o que corrobora a validade da abordagem utilizada.

#### **4.2 Caracterização fenotípica dos isolados rizobianos**

Em sua maioria, os 338 isolados *nodC*<sup>+</sup> são de crescimento rápido, acidificam o meio de cultura e produzem muito muco. Essas características têm sido comumente relatadas para microssimbiontes de diferentes espécies de leguminosas oriundos de solos sob vegetação nativa de regiões semiáridas do Brasil (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014), sendo atribuídas a estratégias de sobrevivência em função das altas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica típicas dessas regiões. Essa característica também reflete na capacidade competitiva das bactérias que, em épocas mais amenas, no período chuvoso, tendem a aumentar sua população mais rapidamente quando comparadas a bactérias de crescimento lento (VAN-GESTEL; LADD; AMATO, 1991).

No presente estudo, aproximadamente 78 % dos isolados são de crescimento rápido, 13 % intermediário e 9 % lento (Figura 11). O predomínio de isolados de crescimento rápido de nódulos de feijão-caupi também foi relatado para isolados nativos não apenas de solo do

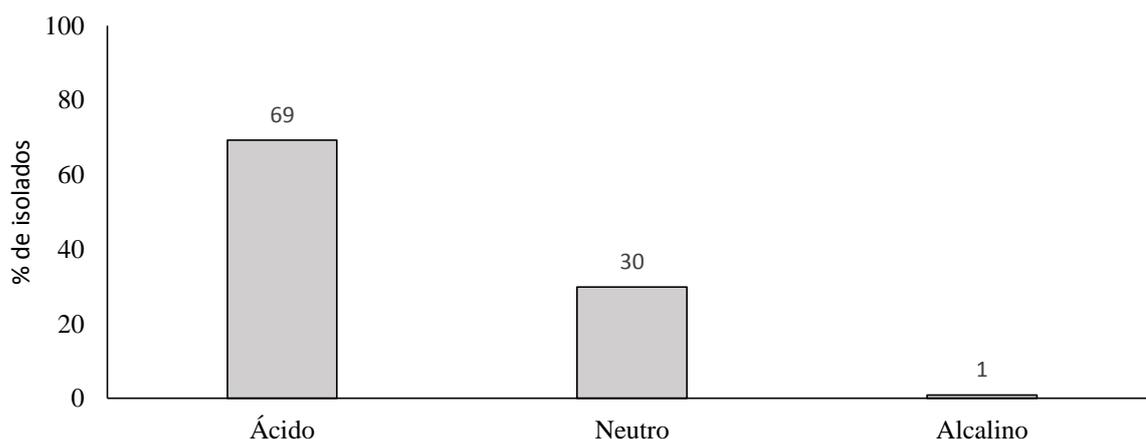
Semiárido de Pernambuco (SILVA et al., 2007), mas do cerrado (CHAGAS-JÚNIOR et al., 2013) e Amazônia (CHAGAS-JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010). A alta frequência de isolados com essa característica, nativos de regiões áridas e semiáridas, também tem sido relatada para outras leguminosas (TEIXEIRA et al., 2010; SHETTA; AL-SHAHARAN; ABDEL-AAL, 2011; FREITAS et al., 2014). Segundo Sharma et al. (2013), isolados de crescimento rápido nativos de regiões com clima adverso, podem apresentar resistência a fatores limitantes, como tolerância a concentrações de sais de  $40 \text{ dS m}^{-1}$  em meio de cultura YMA e de água de irrigação com até  $12 \text{ dS m}^{-1}$  quando em simbiose.



**Figura 11:** Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função do tempo de crescimento

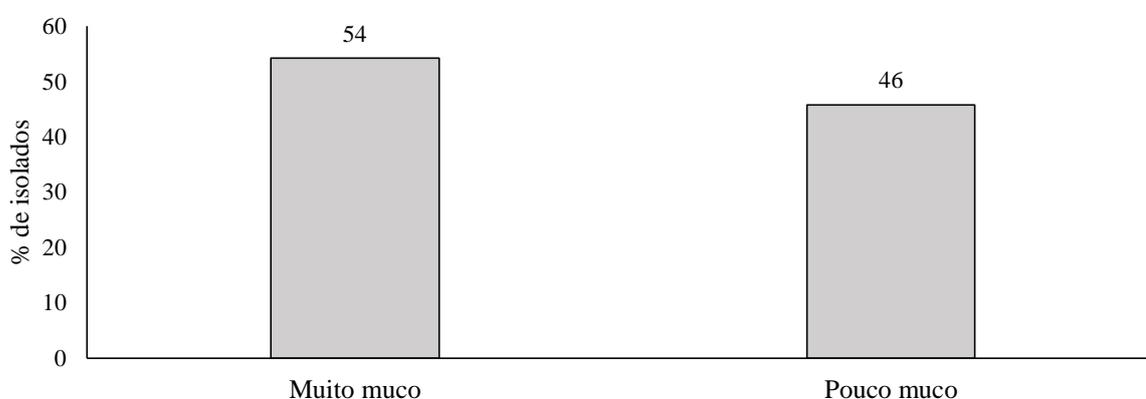
Diferentemente do presente estudo, dos 460 isolados de nódulos de feijão-caupi oriundos de 6 áreas sob cultivo e 1 área nativa do Semiárido brasileiro, Sena (2018) verificou que 60 % dos isolados apresentaram crescimento lento em meio de cultura. No entanto, a maioria dos isolados de crescimento lento foram obtidos de áreas sob cultivo, enquanto que na área nativa, 46 % dos isolados apresentaram crescimento rápido, confirmando a abordagem realizada no primeiro parágrafo deste tópico.

Com base na alteração do pH, 69 % dos isolados acidificaram o meio de cultura, 30 % não modificaram o pH e 1 % alterou o pH para alcalino (Figura 12). Na literatura tem sido verificado que isolados que acidificam o meio de cultura geralmente apresentam crescimento rápido (FREITAS et al., 2014; KAPEMBWA et al., 2016), condizendo com os resultados obtidos no presente estudo.



**Figura 12:** Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da alteração do pH em meio de cultura

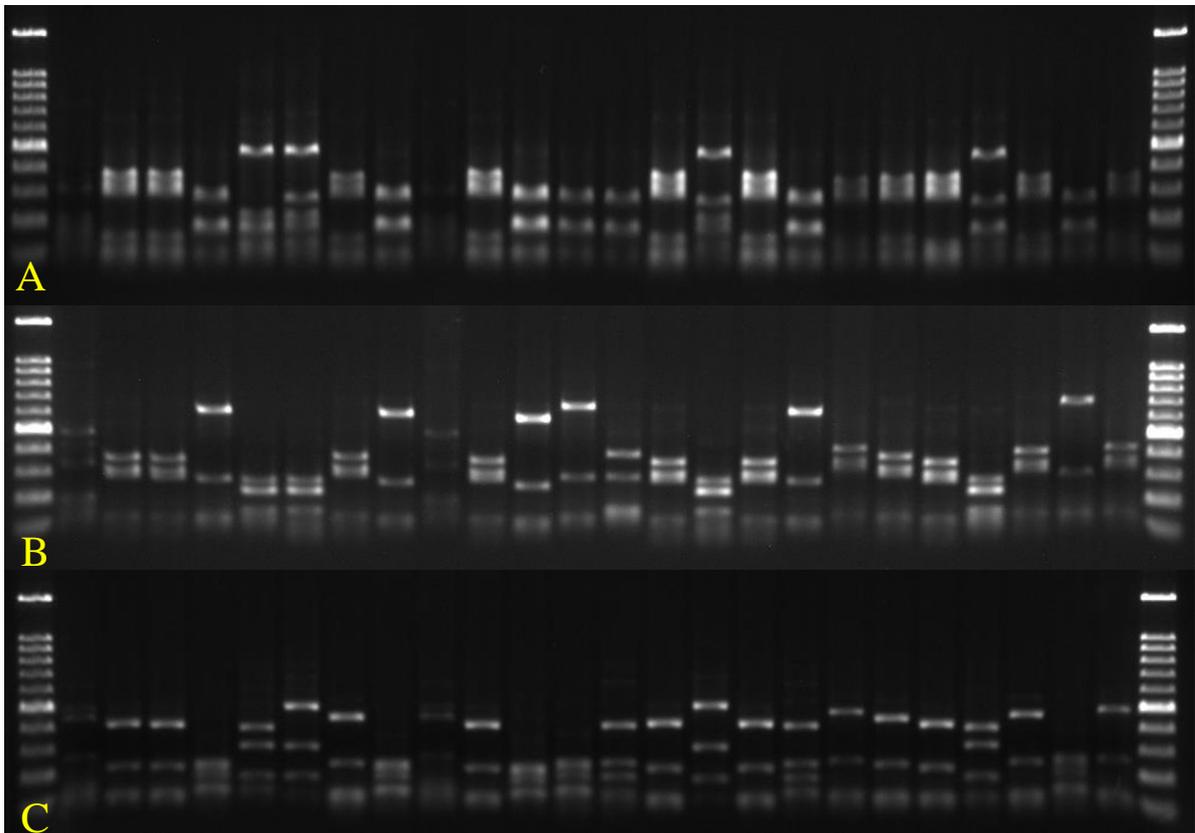
Embora não tenha sido uma diferença muito grande, predominaram isolados com capacidade de produção de muito muco (exopolissacarídeos) (54 %) (Figura 13). Essa característica também está associada a isolados de crescimento rápido, estando diretamente envolvida na capacidade dos isolados em tolerarem condições ambientais adversas (BOMFETI et al., 2011), tais como temperaturas elevadas (SILVA et al., 2007) e acidez do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Polissacarídeos extracelulares são importantes na retenção de água, contribuindo com a formação de um microambiente que protege o micro-organismo, servindo também, de reserva de energia em ambientes onde a disponibilidade de nutrientes é limitada (SAYYED; JAMADAR; PATEL, 2011).



**Figura 13:** Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da quantidade de muco (exopolissacarídeos)

### 4.3 Diversidade genética de rizóbios de nódulos de feijão-caupi utilizando ARDRA

Os 338 isolados obtidos na primeira triagem foram submetidos à Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), para avaliar a variabilidade genética da coleção *nodC+*. A análise conjunta dos perfis de restrição do 16S rRNA obtido a partir das endonucleases *HaeIII*, *MspI* e *Hin6I* de corte frequente (Figura 14), permitiu a formação de dois grandes grupos com 50 % de similaridade que, de acordo com a distribuição das estirpes-referência, consistiu na separação dos isolados nas classes dos alfa e beta-rizóbios (G1 e G2, respectivamente) (APÊNDICE A). Levando em consideração a formação desses dois grandes grupos, nota-se que a proporção de isolados agrupados em G1 e G2 foi de aproximadamente 50%, com 166 isolados agrupando-se aos beta-rizóbios e 172 à alfa rizóbios.



**Figura 14:** Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos do Semiárido de Pernambuco. Enzimas: *HaeIII* (A), *Hin6I* (B) e *MspI* (C)

As estirpes-referência agrupadas em G1 foram: *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571T); *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 06T); *B. neotropicale* (BR10247T); *B. elkanii* (BR2811T); *B. sp.* (BR1436); *Ensifer sp.* (USDA 192); *E. saheli*. (ATCC 51690T); *Microvirga zambiensis* (HIAMBI 3238T); *Ochrobactrum lupini* (DSM 16930<sup>T</sup>); *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

(LMG 8820T) e *R. etli* (CFN 42T). Nesse grupo é possível perceber a separação, em subgrupos, dos isolados agrupados com o gênero *Microvirga* e *Bradyrhizobium*. Um outro subgrupo dos alfa-rizóbios foi representado pelas demais estirpes-referência. Em G2 as estirpes-referência que agruparam os isolados foram: *Paraburkholderia sabiae* (BR3407<sup>T</sup>); *P. tuberum* (STM 678<sup>T</sup>); *P. phymatum* (STM 815<sup>T</sup>); *P. nodosa* (BR3437<sup>T</sup>); *P. mimosarum* (BR10610<sup>T</sup>); e *Cupriavidus taiwannensis* (BR3471<sup>T</sup>).

Ambos os grupos (G1 e G2) foram representados por isolados nativos de todas as classes de solo estudadas (Argissolo, Luvisolo, Planossolo, Neossolo Litólico, Neossolo Quartzarênico e Neossolo Regolítico). No entanto, em G1, as duas classes de solo com maior representatividade em número de isolados foram Planossolo e Argissolo. Do total de 166 isolados, aproximadamente 60% foram obtidos dessas duas classes. Em G2, Luvisolo e Neossolo Litólico foram as classes com o maior número de isolados, sendo responsável por aproximadamente 50% do total de isolados do grupo (172). Na tabela 5 encontra-se o teste qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas quanto a proporção de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa na região Semiárida de Pernambuco. Foi evidenciado que as diferentes classes de solos promoveram diferenças na frequência de alfa e beta-rizóbios.

**Tabela 5:** Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para a proporção de alfa e beta-rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa na região Semiárida de Pernambuco

Classe de solo	Beta-rizóbios		Alfa-rizóbios	Total	
	Observada	(Esperada)			
Argissolo	44	(36,6)	28	(35,36)	72
Latossolo	25	(14,7)	4	(14,24)	29
Luvisolo	21	(35,6)	49	(34,37)	70
Neossolo Litólico	29	(38,6)	47	(37,32)	76
Neossolo Regolítico	6	(3,5)	1	(3,47)	7
Neossolo Quartzarênico	7	(4,07)	1	(3,92)	8
Planossolo	40	(38,6)	36	(37,32)	76

Ao considerar um “threshold” de 100% de similaridade, 209 grupos foram formados, o que permitiu a constatação da grande variabilidade genética existente entre os isolados de rizóbios avaliados. Além disso, nenhum dos 338 isolados apresentou 100% de similaridade com nenhuma das 17 estirpes-referência utilizadas. Esses resultados podem sugerir a presença de rizóbios ainda não descritos. Estudando a diversidade de rizóbios nativos de solos do Submédio do Vale do São Francisco e oriundos de nódulos de feijão-caupi, Leite et al. (2009), utilizando a técnica de ARDRA, também verificaram grande variabilidade genética dos isolados, porém prevalecendo alfa-rizóbios, divergindo do presente estudo.

Em todas as classes de solos constatou-se a presença de rizóbios com perfis muito diverso. Devido a variabilidade dos perfis gerados pela restrição do fragmento do 16S rRNA, foi possível verificar que isolados de nódulos de feijão-caupi encontram-se amplamente distribuídos por todo o Semiárido de Pernambuco. Em função dessa grande variabilidade dos perfis eletroforéticos, não foi possível constatar relação biogeográfica entre os grupos formados e a origem dos isolados. Silva et al. (2012), estudando a diversidade de rizóbios em solos da Amazônia utilizando feijão-caupi como planta-isca, também não verificaram relação entre os agrupamentos e a origem dos isolados. Padrões biogeográficos também não foram observados ao se avaliar a variabilidade genética de rizóbios de *Erythrina velutina* no Semiárido Pernambucano (RODRIGUES et al., 2018). Por outro lado, Mohammed, Jaiswal e Dakora (2018) observaram clara distribuição geográfica entre os rizóbios de feijão-caupi em diferentes regiões da África do Sul. Resultados como estes mostram que no semiárido brasileiro, embora exista uma biodiversidade de rizóbios muito grande, padrões biogeográficos claros ainda não puderam ser observados, já que muitos grupos coabitam os mesmos locais.

A técnica de ARDRA, utilizando as três enzimas citadas acima, foi suficiente para discriminar geneticamente os isolados agrupados em alfa- e beta-rizóbios. Comparando os grupos formados no ARDRA e no sequenciamento dos genes estudados, verifica-se que quase que a totalidade dos isolados sequenciados agruparam-se com os mesmos gêneros utilizados no agrupamento do ARDRA. Essa característica evidencia o caráter filogenético da técnica. Quanto aos poucos isolados que no sequenciamento divergiram do agrupamento do ARDRA, Silva et al. (2012) também verificaram essa característica para isolados de nódulos de feijão-caupi nativos de solos da Amazônia. Para os autores, a razão disso é que a técnica de ARDRA é baseada na presença ou ausência de locais de restrição dentro do “amplicon”, enquanto o sequenciamento compara todas as bases das sequências alinhadas.

Visando reduzir o esforço para o sequenciamento, foi utilizado um “threshold” de 75% de similaridade para selecionar representantes de grupos para o sequenciamento dos genes selecionados. Quarenta e oito grupos foram formados e, em grupos maiores, mais de um isolado foi escolhido. Após adotar esse critério de seleção, dos 338 isolados, 60 foram submetidos à amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA e, dos 60, selecionou-se, aleatoriamente, 30 isolados para serem sequenciados os genes *nodC*, *recA* e *gyrB*.

#### 4.4 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para o posicionamento taxonômico, os 60 isolados selecionados no agrupamento do ARDRA foram submetidos à amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, purificação e sequenciamento. Dos 60 isolados, 41 apresentaram sequências de boa qualidade em ambos os sentidos de sequenciamento (*forward* e *reverse*) após verificação no programa SeqScanner. Estes isolados tiveram os “contigs” montados com ambas as sequências do gene 16S rRNA. As sequências montadas dos 41 isolados foram alinhadas com sequências de estirpes depositadas no banco de dados GenBank. A similaridade dos novos isolados de feijão-caupi variou de 91 a 99 % para aqueles que apresentaram similaridade com o gênero *Paraburkholderia*, 97 a 99 % para os isolados mais próximos do gênero *Bradyrhizobium*, e 86 a 99 % para os isolados similares ao gênero *Rhizobium*. Levando em consideração os isolados submetidos ao sequenciamento, *Paraburkholderia* (18) foi o gênero com maior número de isolados, seguido de *Rhizobium* (13) e *Bradyrhizobium* (10) (Tabela 5).

A proporção de alfa e beta-rizóbios após o sequenciamento do 16S rRNA foi condizente com a encontrada no agrupamento do ARDRA, com populações bem estabelecidas de ambas as classes (Figura 16). Por ser uma espécie de ampla faixa hospedeira, encontrar ampla base genética de alfa-rizóbios estabelecendo simbiose com o feijão-caupi já era esperado, entretanto, a relação de aproximadamente 50/50 entre alfa e beta-rizóbios é novidade para a dinâmica da associação rizóbio x feijão-caupi, sendo uma surpresa encontrar uma população tão representativa de rizóbios classificados como *Paraburkholderia*, associados a esta cultura em solos do Semiárido brasileiro. Embora Leite (2015) tenha verificado a presença de beta-rizóbios associados à cultura e nativos dessa região, o mais comum tem sido a associação com alfa-rizóbios (LEITE et al., 2009; RADL et al., 2014).

A abundante associação de feijão-caupi e *Paraburkholderia* já foi demonstrada no estado de Minas Gerais em áreas de depósito de rejeito de mineração e áreas de vegetação nativa adjacente nos municípios de Brumadinho (Mata Atlântica) e Nova Lima (Cerrado). Neste estudo, a presença de *Paraburkholderia* (principalmente os isolados relacionados com *P. nodosa*) foi em torno de 50% nos solos em área de Cerrado e não foram ocorrentes em Mata Atlântica (CASTRO et al., 2017). Estudo conduzidos no Cerrado brasileiro já demonstrara que *Phaseolus vulgaris* (Tribo Phaseolae, como o feijão-caupi) nodula preferencialmente com *P. nodosa* naqueles solos (DALL’AGNOL et al., 2016). Dados similares não haviam sido mostrado para a Caatinga até o presente, o que indica que há uma diversidade rizobiana não explorada na região.

Dentro do gênero *Paraburkholderia*, a maioria dos isolados apresentaram similaridade com *Paraburkholderia diazotrophica* NKMU-JPY461<sup>T</sup>, um total de 14 isolados com similaridade variando de 91 a 99 %. Os isolados agrupados com esse gênero estão distribuídos em todas as classes de solo e zonas climáticas (Agreste e Sertão) estudadas, abrangendo 13 municípios do Semiárido de Pernambuco (Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, Vertente do Lério, Afrânio, Verdejante, São José do Egito, São Bento do Uma, Venturosa, Terra Nova, Cabrobó, Araripina, Capoeiras e Inajá).

Diferentemente do observado nos estudos discutidos no parágrafo acima, a similaridade das *Paraburkholderia* de feijão-caupi encontradas neste trabalho é congruente com *P. diazotrophica* e não com *P. nodosa*, o que indica que há bactérias diferentes daquelas do Cerrado disseminadas nos solos de caatinga densa avaliados neste estudo.

O bioma Caatinga é rico em espécies vegetais, com destaque para as leguminosas (ZAPPI et al., 2015). Entre as espécies amplamente distribuídas na caatinga e com reconhecida capacidade nodulífera, as pertencentes ao gênero *Mimosa* tem recebido particular atenção devido ao seu comprovado potencial de FBN (FREITAS et al., 2010). Além disso, diversos autores têm relatado que espécies de *Mimosa* se associam preferencialmente com rizóbios pertencentes à classe das beta-proteobactérias, principalmente *Paraburkholderia* (ELLIOTT et al., 2009; BONTEMPS et al., 2010; REIS-JÚNIOR et al., 2010; LIU et al., 2012). A abrangência geográfica da ocorrência das *Mimosa* spp. na caatinga pode ter colaborado para a disseminação dos rizóbios nativos na região.

Cabe ressaltar que os estudos visando avaliar a variabilidade genética dos isolados rizobianos de feijão-caupi, conduzidos até o momento, na região Nordeste, geralmente são conduzidos com amostras de solo, ou plantas, coletadas em áreas agrícolas (MARTINS et al., 2003; LEITE et al., 2009; MARINHO et al., 2017). Nestes estudos, os rizóbios isolados são em sua grande maioria identificados como alfa-proteobacteria. Em estudo também conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade do Estado da Bahia, Sena (2018) isolou e identificou rizóbios de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação nativa e áreas cultivadas. Todos os isolados identificados fazem parte da classe dos alfa-rizóbios, não havendo, portanto, beta-rizóbios nesta coleção. Possivelmente, o manejo do solo para o cultivo deve alterar a estrutura das comunidades rizobianas favorecendo a prevalência dos alfa-rizóbios em detrimento dos betas. De acordo com esta hipótese, estas só puderam ser obtidas neste trabalho por se tratarem de áreas não-manejadas de caatingas densas.

**Tabela 6:** Identificação de 41 isolados bacterianos de feijão-caupi por meio da comparação de sequências do gene 16S rRNA com aquelas de estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank

ID	Solo*	ZC**	Gênero	Identidade (%)	Nº de acesso
<b><i>Paraburkholderia</i></b>					
C31-4	T	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	98	NR 117848.1
C31-3	T	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	98	NR 117848.1
C58-3	T	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	98	NR 117848.1
C58-5	T	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	98	NR 117848.1
C59-4	T	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C61-1	RL	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C37-4	RL	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C100-5	RL	Agreste	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C54-2	RL	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	98	NR 117848.1
C55-2	RL	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C17-5	P	Agreste	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C15-2	P	Agreste	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	97	NR 117848.1
C84-3	S	Agreste	<i>B. cepacia</i>	99	NR 114491.1
C35-3	S	Sertão	<i>P. kururiensis</i> JCM10599 <sup>T</sup>	96	NR 024721.1
C65-3	S	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	99	NR 117848.1
C69-1	L	Sertão	<i>B. cepacia</i>	99	NR 113645.1
C81-3	RR	Agreste	<i>P. phenoliruptrix</i>	99	NR 042901.1
C21-1	RQ	Sertão	<i>P. diazotrophica</i> NKMU-JPY461 <sup>T</sup>	91	NR 117848.1
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>					
C22-5	RQ	Sertão	<i>B. icense</i> LMTR 13	99	NR 133707.1
C21-3/1	RQ	Sertão	<i>B. namibiense</i> 5-10 <sup>T</sup>	99	NR 159233.1
C22-4/1	RQ	Sertão	<i>B. icense</i> LMTR 13	97	NR 133707.1
C51-4	P	Agreste	<i>B. ingae</i> BR 10250 <sup>T</sup>	97	NR 133985.1
C51-5	P	Agreste	<i>B. canariense</i>	98	NR 114199.1
C44-4	P	Sertão	<i>B. yuanmingense</i> NBRC 100594 <sup>T</sup>	99	NR 112928.1
C100-4	RL	Agreste	<i>B. kavangense</i> 14-3 <sup>T</sup>	99	NR 145925.1
C11-1	T	Sertão	<i>B. kavangense</i> 14-3 <sup>T</sup>	99	NR 145925.1
C78-3	S	Sertão	<i>B. elkanii</i> USDA 76	97	NR 036953.1
C69-2	L	Sertão	<i>B. rifense</i> CTAW71	99	NR 116361.2
<b><i>Rhizobium</i></b>					
C66-5	P	Sertão	<i>R. calliandrae</i> CCGE524 <sup>T</sup>	99	NR 109693.1
C67-3	P	Sertão	<i>R. calliandrae</i> CCGE524 <sup>T</sup>	99	NR 109693.1
C43-1	P	Sertão	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	99	NR 114564.1
C11-4/2	T	Sertão	<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 <sup>T</sup>	86	NR 044053.1
C12-2/2	T	Sertão	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	91	NR 116336.1
C13-2	T	Sertão	<i>R. tropici</i> CIAT 899	97	NR 102511.1
C25-2/1	S	Sertão	<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	99	NR 044063.1
C28-4/1	S	Agreste	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	98	NR 114564.1
C90-5	RL	Sertão	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	97	NR 114564.1
C91-3	RL	Sertão	<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	97	NR 044063.1
C82-2	RR	Agreste	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	98	NR 114564.1
C98-3	L	Sertão	<i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	98	NR 114564.1
C66-3	P	Sertão	<i>R. tropici</i> NBRC 15247	98	NR 113739.1

\*P = Argissolo; L = Latossolo; T = Luvisolo; RL = Neossolo Litólico; RQ = Neossolo Quartzarênico; RR = Neossolo Regolítico; S = Planossolo.

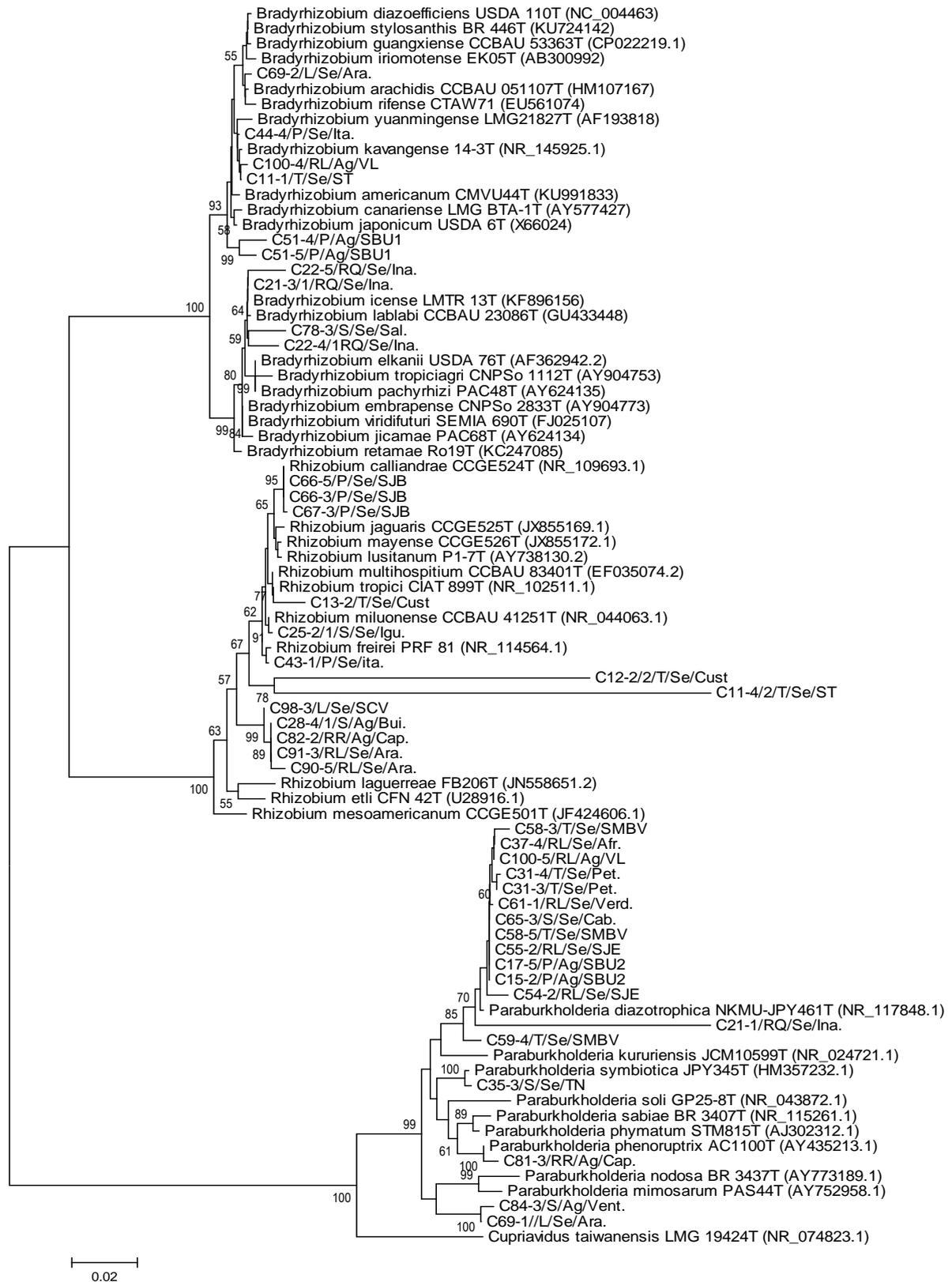
\*\*ZC – zona climática

Todos os isolados classificados como alfa-rizóbios ficaram distribuídos nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Dos isolados agrupados com *Bradyrhizobium*, o isolado C44-4 apresentou 99% de similaridade com a estirpe tipo de *B. yuanmingense* (NBRC 100594<sup>T</sup>). Essa espécie é a mesma utilizada como inoculante comercial para feijão-caupi no Brasil (BR 3267)

(MARTINS et al., 2003; LEITE et al., 2018) e também foi isolada de solo do Semiárido pernambucano. Informações sobre as características dos 41 isolados com sequência de boa qualidade estão disponíveis na tabela 6.

**Tabela 7:** Iniciadores que amplificaram o fragmento do gene *nodC*: **A** - Sarita et al. (2005); **B** - Elliot et al. (2007); Tempo de crescimento: **R** - rápido; **L** - lento, **I** - intermediário; reação de pH: **A** - ácido, **N** - neutro, **Al** - alcalino; tamanho da colônia (TC); cor da colônia (CC): **A** - amarela, **C** - creme; e quantidade de muco (QM): **M** - muito, **P** - pouco, dos 41 isolados que após o sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram sequências de boa qualidade

	<i>nodC</i>	Tempo de crescimento	pH	TC (mm)	CC	QM
<b><i>Paraburkholderia</i></b>						
C31-4	B	R	N	1-2	A	M
C31-3	B	R	A	1-2	A	P
C58-3	B	R	A	>2	C	M
C58-5	B	R	A	>2	C	M
C59-4	B	R	A	>2	A	M
C61-1	B	R	A	>2	C	M
C37-4	B	R	A	1-2	A	P
C100-5	B	R	A	1-2	A	M
C54-2	B	R	A	1-2	A	P
C55-2	B	R	A	1-2	A	P
C17-5	B	R	A	1-2	A	P
C15-2	B	R	A	1-2	A	P
C84-3	B	R	A	1-2	A	M
C35-3	A	R	A	<1	A	P
C65-3	A	R	A	1-2	A	P
C69-1	B	R	N	>2	A	M
C81-3	A	R	A	1-2	C	M
C21-1	B	R	A	>2	A	M
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>						
C22-5	A	I	N	<1	A	P
C21-3/1	B	L	N	<1	A	P
C22-4/1	B	L	AL	<1	A	P
C51-4	A	R	N	<1	A	P
C51-5	A	R	N	<1	A	P
C44-4	B	I	N	<1	C	M
C100-4	B	I	N	<1	C	M
C11-1	A	I	N	<1	C	M
C78-3	B	R	N	<1	A	P
C69-2	A	I	N	1-2	A	P
<b><i>Rhizobium</i></b>						
C66-5	A	R	A	<1	A	P
C67-3	A	R	A	1-2	A	M
C43-1	A	R	A	>2	A	M
C11-4/2	A	R	A	>2	A	M
C12-2/2	B	R	A	>2	A	M
C13-2	B	R	A	>2	A	M
C25-2/1	B	R	A	>2	A	M
C28-4/1	B	R	A	1-2	A	M
C90-5	B	R	A	1-2	A	M
C91-3	B	R	A	<1	A	M
C82-2	B	R	N	<1	A	P
C98-3	B	R	A	1-2	A	M
C66-3	B	R	A	1-2	A	M



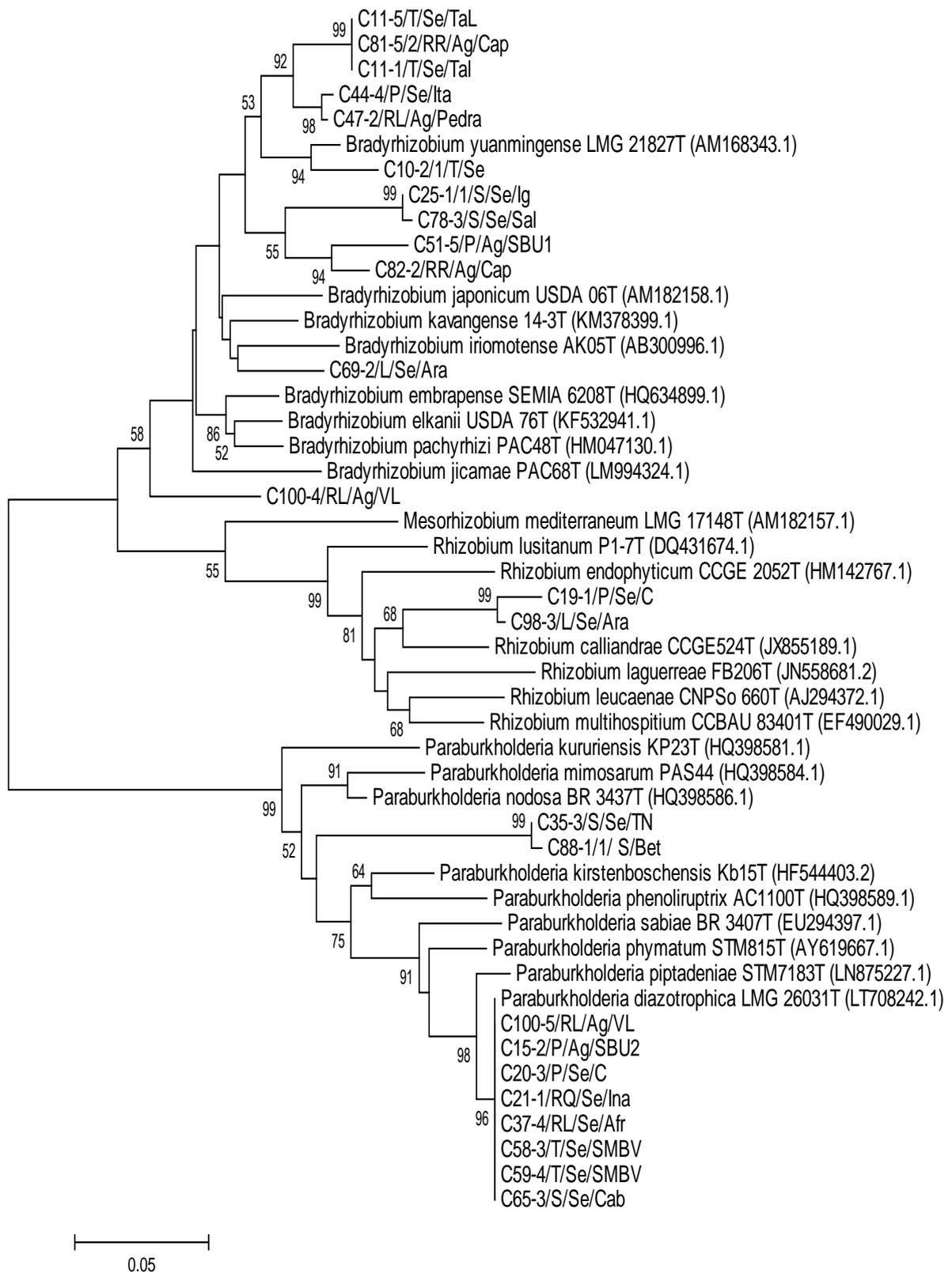
**Figura 15:** Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de 41 sequências de bactérias isoladas de feijão-caupi e de 41 estirpes tipo utilizadas como referência (1152 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições

#### 4.5 Sequenciamento dos genes constitutivos *gyrB* e *recA*

Analisando a árvore com base nos 24 isolados com sequência de boa qualidade do gene *recA* (recombinase A), verificou-se que, oito isolados fazem parte da classe das betaproteobactéria pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* (C35-3, C88-1/1, C100-5, C15-2, C20-3, C21-1, C37-4, C58-3, C59-4 e C65-3). Apesar de ter origem no mesmo clado, os isolados C35-3 e C88-1/1 não apresentaram agrupamento com nenhuma das estirpes tipo de *Paraburkholderia* utilizada como referência. Por outro lado, as sequências dos isolados C100-5, C15-2, C20-3, C21-1, C37-4, C58-3, C59-4 e C65-3 indicaram similaridade próxima de 100 % com a estipe *Paraburkholderia diazotrophica* LMG 26031<sup>T</sup> (Figura 17).

*P. diazotrophica* foi descrita por Sheu et al. (2013). Das cinco estirpes identificadas pelos autores como a nova espécie de *P. diazotrophica*, três são oriundas de nódulos radiculares de espécies de *Mimosa* ocorrentes no Brasil: JPY461<sup>T</sup> - isolada de nódulos de *Mimosa candollei* coletados na Chapada dos Veadeiros, JPY389 - isolada de nódulos de *Mimosa pudica* da Chapada Diamantina e JPY359 – isolada de nódulos de *Mimosa tenuiflora* coletados de árvores no estado da Bahia. *M. tenuiflora* é uma espécie que ocorre em oito dos nove estados da região Nordeste, excetuando-se o estado do Maranhão, sendo amplamente distribuída no bioma Caatinga (APNE/CNIP, 2014). É provável, portanto, que a espécie tenha contribuído com a dispersão de *P. diazotrophica* nos solos da região. Esse fato pode justificar a alta similaridade dos 8 isolados agrupados com *P. diazotrophica* obtidos no presente estudo e com distribuição em cinco classes de solo.

Para os alfa-rizóbios, apenas 2 isolados (C19-1 e C98-3) agruparam com o gênero *Rhizobium*, apresentando similaridade inferior a 94 % com a espécie *Rhizobium calliandrae* CCGE524<sup>T</sup>. O isolado 100-4 não agrupou com nenhuma das estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas. Dez dos doze isolados agrupados com o gênero *Bradyrhizobium* ficaram mais próximos de *Bradyrhizobium yuanmingense*, uma espécie que já foi relatada habitando solos do Semiárido brasileiro, sendo de grande importância para a FBN em feijão-caupi.



**Figura 16:** Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências parciais do gene *recA* de 24 sequências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências (315 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições

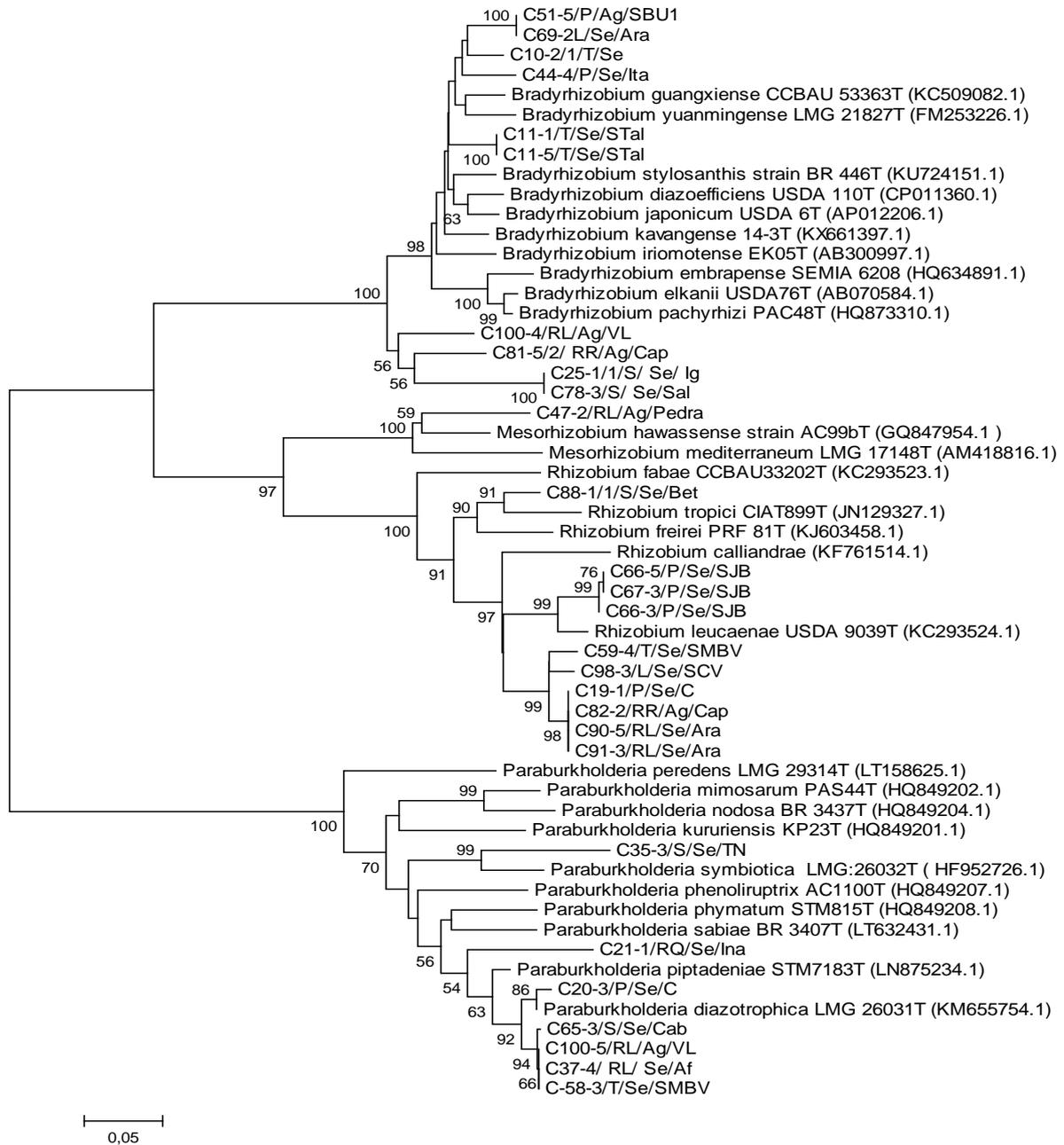
Na árvore filogenética construída com as sequências parciais do gene *gyrB* (DNA girase subunidade B) é possível verificar que a maioria dos isolados agrupados com *Paraburkholderia* (C58-3, 37-4, C100-5, C65-5 e 20-3) também apresentaram alta similaridade com a espécie *P. diazotrophica*, reforçando o que tem sido verificado nas árvores anteriores. C35-3 e C21-1 foram os isolados que mais se distanciaram das estirpes referência de *Paraburkholderia* utilizadas na árvore (Figura 18).

A análise filogenética do gene *gyrB* foi a única que separou os isolados rizobianos em quatro gêneros (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia* e *Mesorhizobium*). Mesmo apresentando similaridade inferior a 94 %, o isolado C47-2 foi o único com maior proximidade com a espécie *Mesorhizobium hawansense*. Nessa árvore é possível perceber que tanto isolados obtidos do mesmo solo (C11-1 e C11-5), quanto de solos diferentes (C19-1, C82-2, C90-5 e C91-3), apresentam alta similaridade.

A maioria dos isolados de feijão-caupi avaliados no presente estudo apresentou congruência no posicionamento nas árvores filogenéticas construídas com as sequências dos genes *recA*, *gyrB* e com o gene ribossomal 16S rRNA. Entretanto, ao se analisar as três árvores, é possível observar que há isolados que apresentaram afiliação filogenética distinta a depender do gene utilizado. O isolado C59-4, por exemplo, tanto no sequenciamento do gene 16S rRNA quanto no gene *recA*, foi classificado como pertencente ao gênero *Paraburkholderia*, apresentando maior similaridade com *P. diazotrophica*. O mesmo isolado apresentou na sequência do gene *gyrB*, afiliação filogenética com o gênero *Rhizobium*. O mesmo comportamento foi verificado para o isolado C47-2. A sequência do gene *recA* desse isolado apresentou afiliação filogenética com o gênero *Bradyrhizobium* enquanto que a sequência do *gyrB* agrupou com o gênero *Mesorhizobium*. Afiliação filogenética divergente também foi verificada para as sequências do gene *recA* e *gyrB* do isolado C88-1, onde pode ser observado o agrupamento com *Paraburkholderia* e *Rhizobium*, respectivamente.

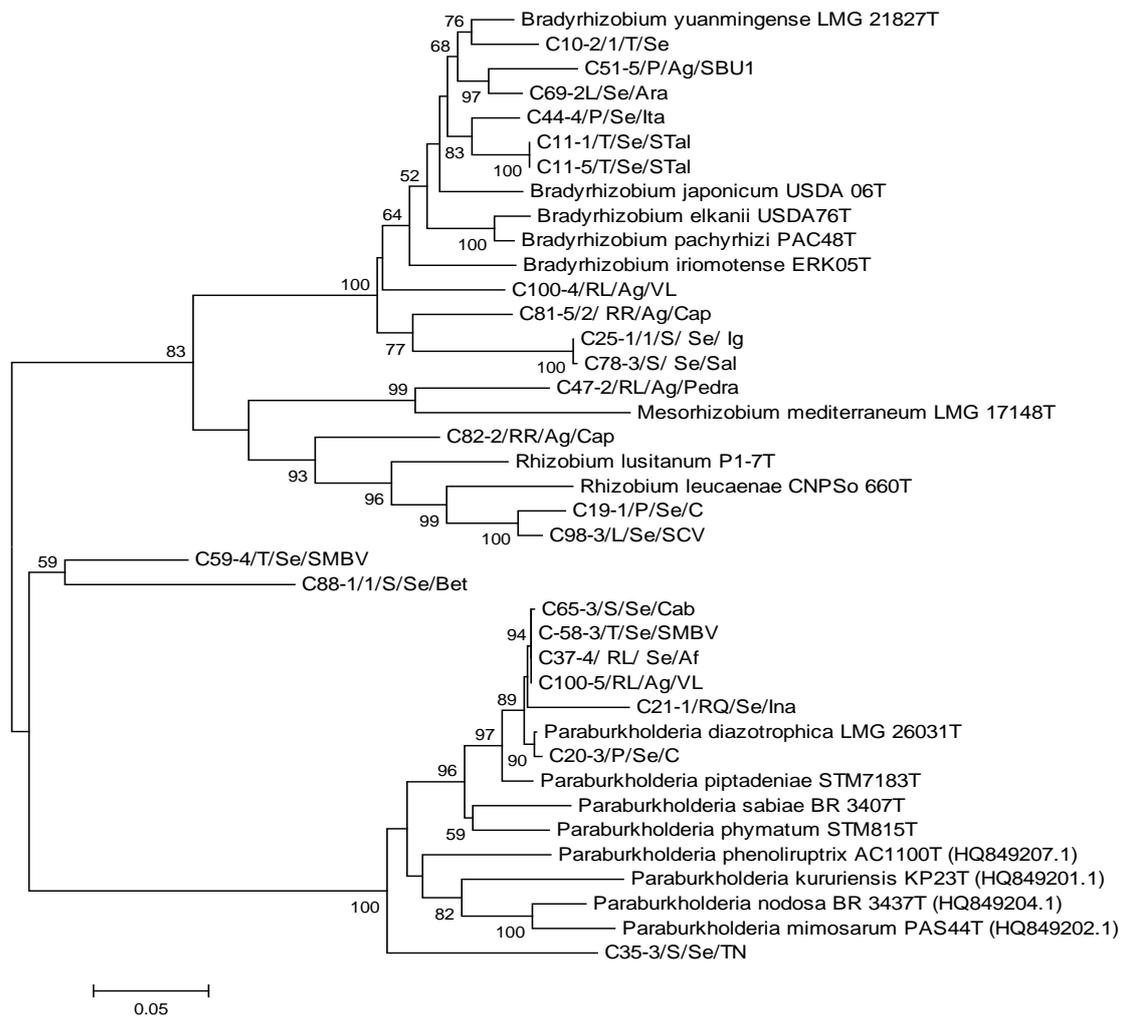
Pela boa qualidade das sequências obtidas, avaliada por meio do programa SeqScanner, essa divergência não pode ser atribuída à má qualidade das sequências obtidas ou à contaminação do DNA por DNA de outra bactéria e indica a elevada variabilidade genética dos isolados obtidos nos solos de caatinga densa. Genes constitutivos podem ser transferidos entre bactérias por meio do mecanismo de transferência horizontal de genes (THG) como já foi observado em estirpes rizobianas de áreas de vegetação nativa (TAN et al., 2012). A THG tem um papel importante na evolução e adaptação das estirpes rizobianas (MASSON-BOIVIN et al., 2008, ANDREWS et al., 2018). Este fenômeno tem sido documentado extensivamente com a análise de genes simbióticos, como será discutido a seguir. Entretanto, este evento evolutivo

pode ocorrer também com genes constitutivos, uma vez que grandes porções de DNA podem ser incorporados aos genomas bacterianos (SULLIVAN; ROSON, 1998).



**Figura 17:** Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências parciais do gene *gyrB* de 28 seqüências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 27 estirpes tipo utilizadas como referências (414 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições

A concatenação das sequências dos genes *gyrB* e *recA* foi realizada e a árvore filogenética com base nessas sequências foi gerada (Figura 19). Nesta árvore é possível observar que muitos dos isolados mantiveram as suas afiliações filogenéticas observadas nas árvores dos genes individuais. Geralmente com menor similaridade, pela soma das bases não congruentes com as sequencias das estirpes de referência, o que é normal e esperado para este tipo de análise.



**Figura 18:** Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências parciais concatenadas dos genes *gyrB* + *recA* (729 pb) de 22 sequências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 16 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições

Por apresentarem sequências de *recA* e *gyrB* divergentes, os isolados C88-4 e C59-4 formaram um grupo com baixa similaridade com os demais, e dentro do grande grupo dos beta-rizóbios. Dentro dos grupos de alfa- e beta-rizóbios formados, é possível observar grupos isolados e com baixa similaridade com os grupos formados pelas estirpes de referência, como é o caso do grupo formado pelos isolados C11-1, C11-5 e C44-4 (*Bradyrhizobium*), C81-5/2, C25-1/1 e C78-3 (*Bradyrhizobium*), C19-1 e C98-3 (*Rhizobium*), C65-3, C58-3, C37-4, C100-5 e C21-1 (*Paraburkholderia*). Este padrão de agrupamento demonstra a elevada variabilidade genética dos isolados obtidos neste estudo e aponta para a existência de novos grupos taxonômicos dentre os isolados obtidos.

Poucos estudos foram conduzidos, até o momento, com a avaliação de mais de um gene constitutivo em rizóbios no nordeste Brasileiro. Para a cultura da soja, a variabilidade genética de estirpes de *Bradyrhizobium* oriundas de diversas regiões do Brasil, inclusive nos estados do PI e BA, também foi muito elevada, entretanto, os grupos constituídos por meio das análises das sequências concatenadas dos genes constitutivos agrupou os *Bradyrhizobium* a estirpes tipo desse gênero (RIBEIRO et al., 2015). Em estudos com o objetivo de descrever novas espécies de rizóbio, como *Microvirga vignae*, por exemplo (RADL et al., 2014), o padrão do agrupamento dos isolados em árvores filogenéticas contruídas com sequencias concatenadas de genes constitutivos apresentam o mesmo padrão da árvore apresentada na Figura 19, o que reforça a possibilidade de termos acessado isolados ainda não descritos.

Alguns pesquisadores utilizam a concatenação das sequências dos genes constitutivos com os ribossomais (como o 16S rRNA), por exemplo (DALL'AGNOL et al., 2016; PIRES et al., 2018). Entretanto nós não empregamos esta abordagem pois os genes constitutivos e os ribossomais apresentam tamanhos muito distinto e graus de conservação muito divergentes. Como é possível observar nas sequencias obtidas a partir dos rizóbios de feijão-caupi, a similaridade média das sequências do gene 16S rRNA com aquelas disponíveis nos bancos de dados foi de 98,5%, enquanto as sequencias do gene *recA* apresentou similaridade média de 94%. A concatenação de sequencias tão díspares leva a redução do poder discriminativo dos genes constitutivos e agrupa as bactérias pela similaridade do gene 16S rRNA, que é maior e mais conservado.

#### 4.6 Sequenciamento do gene simbiótico *nodC*

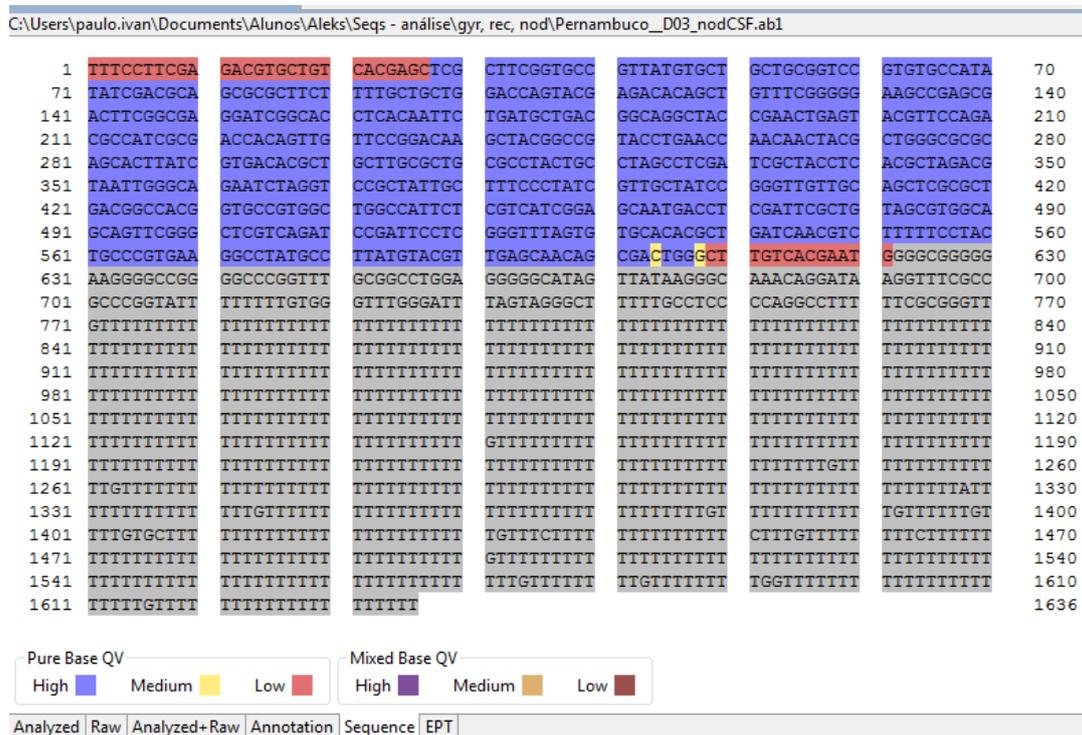
Após ser verificada a qualidade das sequências dos 30 isolados submetidos ao sequenciamento do gene *nodC*, 26 apresentaram sequência de boa qualidade.

Os 26 isolados identificados foram distribuídos nos gêneros *Bradyrhizobium* (10), *Rhizobium* (7) e *Paraburkholderia* (9). Dos 10 isolados agrupados com o gênero *Bradyrhizobium*, 4 (C69-2, C10-2/1, C11-1, C11-5) fazem parte do grupo que engloba as espécies *B. vignae* 7-2<sup>T</sup>, *B. yuanmingense* NBRC 100594<sup>T</sup>, *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup> e *B. japonicum* USADA 6<sup>T</sup>; 2 (C47-2, C44-4) são mais próximos de *B. stylosanthis* BR 446<sup>T</sup>; 2 (C78-3, C25-1/1) apresentam maior similaridade com a estirpe não-tipo *Bradyrhizobium* sp. BRUESC765 e 2 (C100-4 e C51-5) com BRUESC763. Todos os isolados agrupados com o gênero *Rhizobium* (C82-2, C67-3, C66-5, C19-1, C98-3, C90-5 e C91-3) são mais próximos de *Rhizobium* sp. Angicol\_417 e *Rhizobium* sp. POS\_MRA, dois *Rhizobium* não tipos isolados no Brasil e na África do Sul, respectivamente. O grupo representado pelo gênero *Paraburkholderia* agrupou os isolados C65-3, C59-4, C58-3, C100-5, C37-4, C15-2 (apresentando maior proximidade com a espécie *P. diazotrophica* JPY461<sup>T</sup>); C21-1, C20-3 (mais próximos de *P. phenoliruptrix* BR3459<sup>T</sup>; *P. phymatum* STM815<sup>T</sup> e *Paraburkholderia* sp. BRUESC14) e C35-3 que não agrupou com nenhuma das estirpes-referência utilizadas.

O fato da sequência do isolado C35-3 ter ficado muito distante das estirpes de referência, apresentando baixa similaridade tanto com os demais isolados deste estudo quanto com as estirpes tipo e não-tipo, existe a possibilidade de ser uma bactéria completamente nova, principalmente por ser um isolado com uma sequência de boa qualidade, o que reduz a possibilidade de erros na amplificação e contaminações com DNAs de outros rizóbios (Figura 20), reforçando a possibilidade de esta bactéria poder pertencer a um novo simbiovar de *Paraburkholderia*. Para o agrupamento dos alfa-rizóbios, nenhum dos isolados apresentou 100% de similaridade com nenhuma estirpe tipo, o que pode indicar novos simbiovars de rizóbio (ROGEL; ORMENO-ORRILLO; MARTINEZ ROMERO, 2011).

O isolado C35-3 foi classificado como *Paraburkholderia* sp. com similaridade de 96% com a estirpe tipo *Paraburkholderia kururiensis* KP23<sup>T</sup>. Na árvore filogenética do gene 16S rRNA, esse isolado se agrupou a *P. symbiotica* e se distanciou das estirpes de referência nas árvores dos genes *recA*, *gyrB* e na árvore filogenética concatenada, formando um grupo isolado dentro dos beta-rizóbios. Dessa forma, é possível observar que o mesmo padrão de distanciamento das estirpes utilizadas como referência, é verificado para a análise de todas as

sequencias do isolado C35-3, indicando que essa bactéria pode ser um novo taxa de beta-rizóbio.



**Figura 19:** Análise da qualidade da sequência parcial do gene *nodC* da estirpe de *Paraburkholderia* sp. C35-3 por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 576 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20)

Ao analisar a árvore filogenética com as sequencias do gene *nodC* é possível observar que todos os isolados agrupados com o gênero *Paraburkholderia*, com exceção do isolado C35-3, apresentaram alta similaridade com as estirpes de referência, enquanto que nos isolados agrupados com os alfa-rizóbios, muitos ficaram distantes (Por exemplo, o grupo formado pelos *Rhizobium* spp. C98-3, C19-1, C66-5, C67-3 e C82-2, além dos grupos formados pelos três pares de *Bradyrhizobium* spp. C25-1 e C78-3; C44-4 e C47-2; C11-1 e C11-5) (Figura 21). Estes resultados indicam que a origem dos genes *nodC* em *Paraburkholderia* é monofilética enquanto nos alfa-rizóbio não há monofilia. Este padrão contradiz os argumentos da distribuição dos genes *nods* monofiléticos em alfa e não monofiléticos em beta-rizóbios, sugerido por Estrada de Los Santos et al. (2018) a partir de análises de sequências de genes de nodulação e em genomas completos disponíveis nos bancos de dados públicos.

Esta comprovação ressalta a possibilidade dos fenômenos evolutivos de THG entre as estirpes de rizóbio naturalmente estabelecidas nos solos do Semiárido. Os genes simbióticos geralmente estão organizados em plasmídeos simbióticos (pSym) ou em “ilhas simbióticas”

(IS) no cromossomo bacteriano. Transferência horizontal de genes simbióticos por meio do compartilhamento de IS ou pSym completos já foi demonstrada na literatura (SULLIVAN; RONSON, 1998; ITAKURA et al., 2009; PARKER; ROUSTEAU, 2014; LEMAIRE et al., 2015; LING et al., 2016; DLUDLU et al., 2018b). A importância da THG para o desempenho dos pepéis ecológicos das bactérias edáficas em seus nichos foi irrefutavelmente demonstrada por Gilbert et al. (2010) em um experimento onde o pSym de uma estirpe de *Cupriavidus taiwanensis* foi sintetizado e liberado em um experimento de microcosmo, podendo então, ser incorporado por uma estirpe do patógeno *Ralstonia solanacearum* que possibilitaram a este isolado nodular e formar nódulos vermelhos em *Mimosa* sp. Assim, a aquisição de uma IS ou pSym por isolado rizobiano, o que pode ocorrer no solo mas é favorecido no ambiente nodular (LING et al., 2016), pode determinar o aumento ou diminuição da eficiência simbiótica e competitiva de uma estirpe rizobiana.

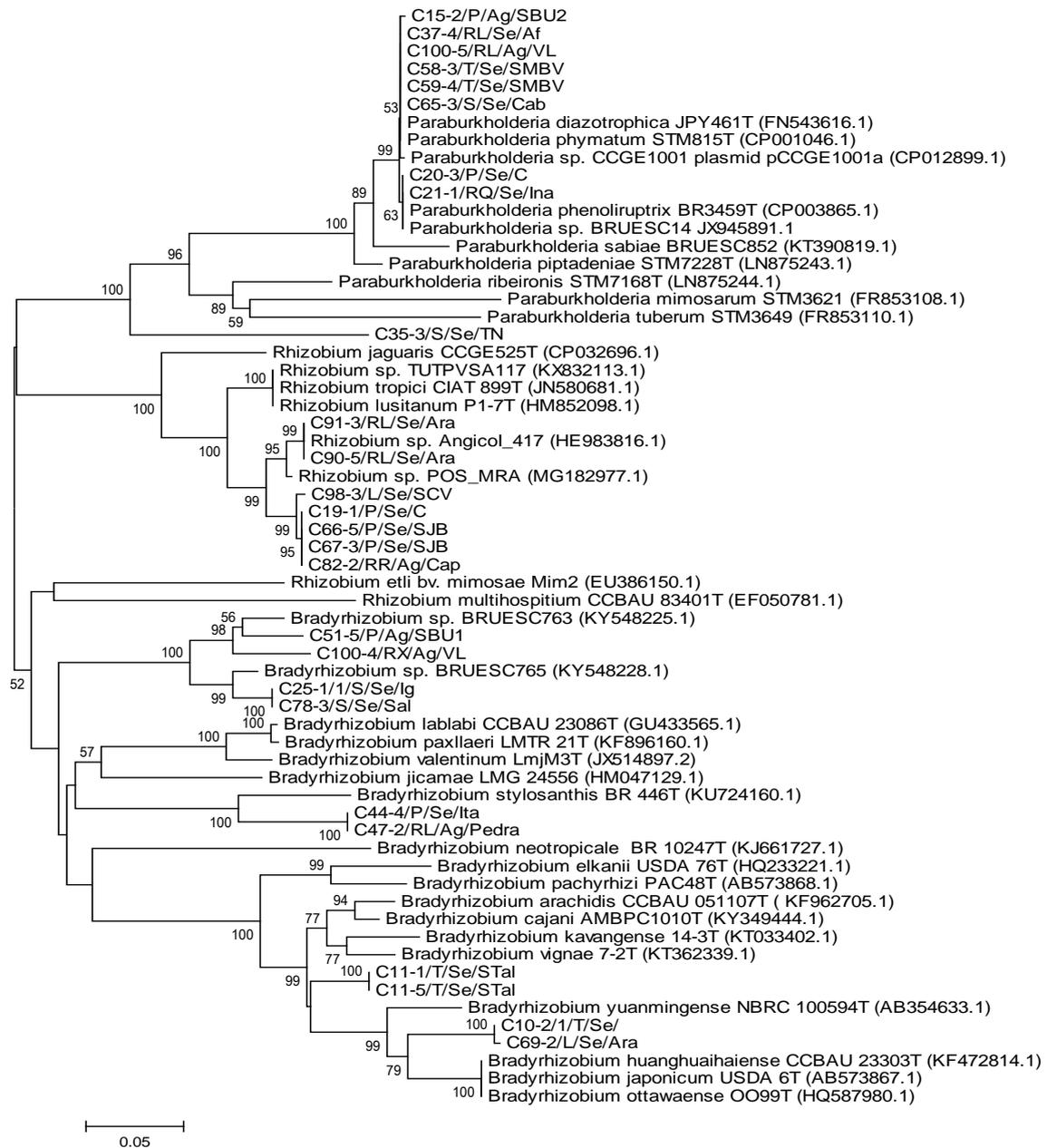
No Brasil, a THG já foi observada em uma variante do inoculante comercial da soja (*Bradyrhizobium elkanii*) estabelecida em solos do Cerrado, recebendo os genes *nifH* de um *Ensifer fredii* nativo (BARCELLOS et al., 2007). Estudos com avaliação das sequências de genes constitutivos e simbióticos de *Paraburkholderia* isoladas de *Mimosa* spp. em solos do Cerrado Brasileiro demonstraram haver alta congruência entre as árvores construídas com base nos genes *nodC* e constitutivos, o que indica baixa THG (PIRES et al., 2018), corroborando com os dados do presente estudo e também contradizendo a hipótese da polifilia dos genes simbióticos em *Paraburkholderia*.

Em estudos de alfa rizóbios de feijão-caupi, a congruência entre as árvores filogenéticas dos genes constitutivos e simbióticos tem sido observada em alguns estudos e não-observada em outros (TAMPAKAKI et al., 2017, MOHAMMED; JAISWAL; DAKORA, 2018), o que ressalva a já conhecida promiscuidade do feijão-caupi e que sua comunidade rizobiana associada pode variar em função da localidade do isolamento. Além da possibilidade dos eventos de THG, a divergência das sequências dos alfa-rizóbios obtidos neste trabalho indica a existência de novos simbiovares de rizóbio de feijão-caupi, como já observado para alfa-rizóbios de origem européia (GUERROUJ et al., 2013; RAMIREZ-BAHENA et al., 2016) e africana (MOHAMMED; JAISWAL; DAKORA, 2018), além *Bradyrhizobium* brasileiros (HELENE et al., 2016).

Considerando a origem das bactérias, a maioria dos isolados divergentes das estirpes de referência com base nas sequências do gene *nodC* foram originárias do Sertão pernambucano. Esta observação reforça a necessidade de investimentos em pesquisa no estudo para avaliar a variabilidade genética de bactérias nodulantes no Sertão, uma vez que há pouco conhecimento

acumulado sobre estas populações de rizóbio, em especial aplicando-se a abordagem de MLSA utilizada no presente estudo. Outra observação a partir desta constatação, está na possibilidade de haver um ambiente propício para os eventos evolutivos de THG. Entretanto, novos isolamentos e experimentos devem ser realizado para se corroborar esta hipótese.

A utilização da abordagem MLSA para a avaliar a variabilidade genética de estirpes rizobianas tem sido difundida nos últimos anos e é uma ferramenta relativamente nova para os estudos de diversidade rizobiana. É abordagem obrigatória para os estudos envolvendo a descrição de novas espécies, mas em estudos básicos de diversidade a sua aplicação gera importantes direcionamentos a respeito do posicionamento taxonômico dos isolados, bem como sua ecologia, conforme podemos observar com as estirpes estudadas neste trabalho. Considerações sobre THG e indicação de possíveis novas taxa não poderiam ter sido alcançadas ou seriam apenas parcialmente com a utilização apenas das sequencias do gene 16S rRNA, gene mais utilizado nos estudos de diversidade rizobiana.



**Figura 20:** Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências parciais do gene *nodC* de 26 sequências de bactérias isoladas do feijão-caupi e de 36 estirpes de referência (438 pb). Números nas ramificações representam os valores de bootstrap com 1000 repetições

#### **4.7 Produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato de cálcio e produção de biofilme “in vitro”**

Dos 60 isolados avaliados quanto a produção de AIA em meio de cultura suplementado com L-triptofano, 52 foram capazes de produzir este fitohormônio. A equação  $0,0032x + 0,0386$  ( $R^2=0,99$ ), criada a partir de concentrações conhecidas de AIA sintético, foi utilizada para os cálculos de estimativa. Na tabela 8 é possível observar que isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi produzem AIA nas mais diversas concentrações. Os valores obtidos variaram de 10  $\mu\text{M}$  para o isolado C58-5, a 275  $\mu\text{M}$  para o isolado C21-3/1. A máxima produção de AIA foi alcançada pelos isolados C21-3/1, C102-3, C77-2, C22-5 e C11-1, ao obterem valores de 275, 272, 264, 271, 265  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Ao levar em consideração a estirpe de referência BR 3267, dez isolados (C58-3, C19-1, C21-1, C51-4, C69-2, C21-3/1, C102-3, C77-2, C22-5 e C11-1) produziram concentrações de AIA superiores à esta estirpe comercial.

Por ser um fitohormônio de grande importância para o crescimento vegetal e para a interação rizóbio-leguminosa (GHOSH et al., 2015), diversos estudos avaliando a capacidade de rizóbios em produzir AIA tem sido relatado na literatura. É importante salientar que a síntese de AIA em meio de cultura não está relacionada apenas a capacidade do isolado em produzir este hormônio de crescimento vegetal. Segundo Costa et al. (2013), o tipo de meio de cultura utilizado para este tipo de avaliação pode subestimar a produção de AIA. Os mesmos autores verificaram que ao utilizar o meio DYGS, constatou-se uma redução na síntese de compostos indólicos. Assim, embora o meio YM seja bastante utilizado para se avaliar a produção de AIA, as baixas concentrações obtidas por alguns isolados e a inexistência de produção por outros no presente estudo, pode ser justificada, em parte, pelo meio de cultura utilizado.

**Tabela 8:** Produção de AIA, capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e produção de biofilme por rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa do Semiárido pernambucano

(Continua)			
ISOLADO	AIA ( $\mu\text{M}$ )	Índice de solubilização (IS)	Biofilme ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
C37-4	162 h	-	-
C66-5	51 k	-	-
C15-2	32 m	-	-
C31-3	13 n	-	6,16 d
C61-1	192 e	-	-
C11-1	265 a	-	5,65 d
C36-2/1	17 n	-	10,75 c
C69-2	220 c	-	-
C100-5	-	-	10,75 c
C97-1	58 k	-	5,60 d
C51-5	159 h	-	16,22 c
C25-1/1	-	-	-
C66-3	23 m	-	6,35 d
C51-4	220 c	-	14,96 c
C78-3	167 g	-	30,62 a
C82-5	16 n	-	-
C22-5	271 a	-	-
C38-3	50 k	-	-
C21-1	244 b	1,95 b	-
C84-3	-	1,76 c	-
C11-5	-	-	6,66 d
C19-1	205 d	-	7,29 d
C25-2/1	93 i	-	5,47 d
C77-2	264 a	-	5,97 d
C13-2	-	-	12,76 c
C58-3	245 b	-	-
C90-5	173 g	-	-
C35-3	42 l	-	-
C81-3	-	-	-
C88-1/1	168 g	-	6,79 d
C58-5	10 n	-	5,59 d
C87-3/1	81 j	1,83 c	-
C54-2	-	-	7,67 d
C98-3	177 f	-	9,69 c
C47-2	35 l	1,37 d	11,19 c
C28-4/1	-	-	-
C46-2	177 f	2,12 a	-
C100-4	80 j	-	-
C12-2/2	11 n	-	13,83 c
C31-4	42 l	-	6,73 d
C43-1	26 m	-	-

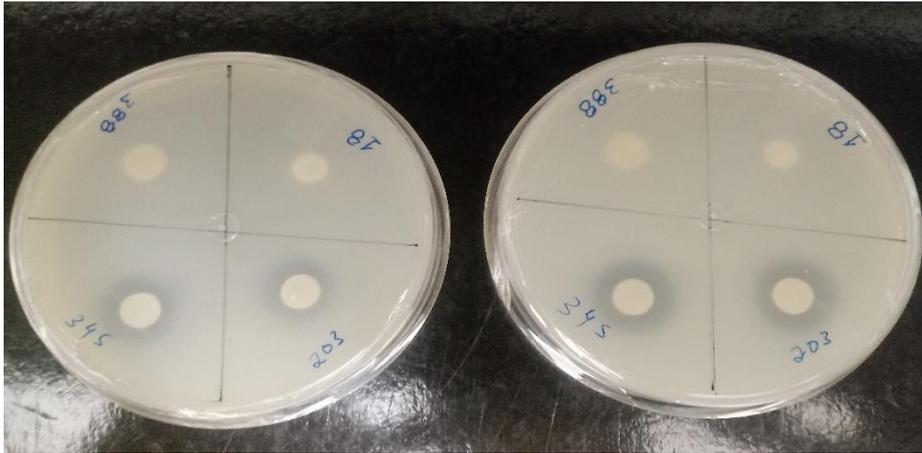
**Tabela 8:** Produção de AIA, capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e produção de biofilme por rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa do Semiárido pernambucano

			(Conclusão)
C81-5/2	52 k	-	7,85 d
C102-3	272 a	-	13,01 c
C65-3	27 m	-	6,41 d
C67-3	24 m	-	16,41 c
C28-5/2	42 l	1,81 c	-
C42-4/2	93 i	-	9,30 c
C20-3	53 k	-	5,97 d
C22-4/1	15 n	-	13,27 c
C59-4	12 n	-	-
C11-4/2	179 f	-	15,27 c
C82-2	45 l	-	8,67 c
C10-2/1	18 n	-	7,10 d
C91-3	186 f	-	-
C55-2	161 h	-	22,76 b
C44-4	-	-	-
C17-5	42 l	1,97 b	-
C69-1	14 n	1,36 d	-
C21-3/1	275 a	-	11,94 c
C33-4/1	156 h	-	15,27 c
BR 3267	196 e	-	-
CV (%)	6	35	64

Os dados são médias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste scott knot ( $p < 0,05$ )

Conforme descrito no material e métodos, os isolados também foram avaliados quando a produção de sideróforos. No entanto, do total de 60 isolados, apenas 1 apresentou este mecanismo de promoção de crescimento. Devido a ausência desta característica pela maioria dos isolados e pela estirpe de referência BR 3267 (impossibilitando comparações), estes dados não foram inclusos. Porém, a ausência deste mecanismo nos isolados não significa dizer que sejam pouco competitivos ou ineficientes na promoção de crescimento vegetal.

Quanto a habilidade dos isolados em solubilizar fosfato de cálcio em meio GL, 8 dos 60 isolados apresentaram esta característica. O indicativo da capacidade de solubilização pelos isolados foi a presença de um halo transparente ao redor da colônia, conforme pode ser observado na figura 21. A estirpe de referência BR 3267 não apresentou capacidade de solubilização de fosfato de cálcio no presente estudo.



**Figura 21:** Halo de solubilização de fosfato de cálcio formado por isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa

O isolado com maior capacidade de solubilização foi o C46-2 com 2,12 de IS, seguido dos isolados C17-5 e C21-1, com 1,97 e 1,95 (IS), respectivamente. A baixa frequência de isolados com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, verificada no presente estudo, pode estar relacionada a ausência da capacidade de solubilização por parte do isolado ou devido a fonte de carbono utilizada. Chagas Júnior et al. (2010) também verificaram baixa frequência de isolados de nódulos de feijão-caupi quanto a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. Embora o meio GL seja utilizado por diversos pesquisadores para verificar a capacidade de isolados de rizóbios em solubilizar fosfato de cálcio e, mesmo com sua descrição a mais de 30 anos por Sylvester-Bradley et al. (1982), a glicose, fonte de carbono utilizada neste meio, pode inibir a expressão de tal característica em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (OLIVEIRA, 2009).

Variabilidade na produção de biofilme também foi verificada por parte dos isolados aqui avaliados. De todos os isolados testados, 34 foram positivos para a presença desta característica (Tabela 8). Os valores de biofilme obtidos no presente estudo variaram de 5,47 a 30,62  $\mu\text{M mL}^{-1}$ . Dos isolados produtores de biofilme, C78-3 foi o que apresentou a maior produção, sendo estatisticamente superior a todos os isolados produtores. A estirpe BR 3267 não produziu biofilme.

Produzir biofilme é uma característica muito importante que auxilia os micro-organismos na proteção de condições estressantes (NOCELLI et al., 2016), pois são constituídos principalmente de exopolissacarídeos (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA; 2015). Além disso, o biofilme está envolvido em inúmeros processos relacionados a interação planta-micro-organismos, como é o caso da formação dos nódulos durante o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa (WANG et al., 2008), estando envolvido no quórum sensing (mecanismo pelo qual as bactérias se comunicam).

#### **4.8 Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono**

Os 60 isolados selecionados a partir do ARDRA foram testados quanto a habilidade de metabolizar dez fontes de carbono. De todas as fontes utilizadas no presente estudo, ácido maléico foi a única que limitou o crescimento dos isolados, não sendo metabolizado por nenhum dos isolados avaliados (Tabela 9). Nunes et al. (2018), ao realizar a caracterização polifásica de bactérias de nódulos de leguminosas forrageiras no semiárido brasileiro, verificaram que ácido maléico foi uma das fontes que mais limitou o crescimento dos isolados. Segundo Berge et al. (2009), fontes de carbono do grupo dos ácidos geralmente são pouco metabolizadas por isolados rizobianos.

Amido, arabinose, CMC, cellobiose, frutose, glicose, maltose e manitol foram metabolizadas por 100 % dos isolados. Por se tratar da fonte de carbono utilizada no meio YM, o manitol foi utilizado como controle positivo, e sua metabolização pela totalidade dos isolados já era esperada. Quanto a xilose, apenas os isolados C46-2 e C11-1 foram incapazes de metabolizar esta fonte. Com exceção dos dois isolados citados acima, os demais tiveram o mesmo comportamento da estirpe de referência BR 3267.

A capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono por rizóbios já foi descrita por diversos autores (MEYER et al., 2014; SAIDI et al., 2014; SHEU et al., 2015; NUNES et al., 2018). Muitas fontes de carbono são secretadas pelos vegetais e depositadas na rizosfera. Rizóbios que apresentam a versatilidade metabólica de utilizar as mais diversas fontes de carbono presentes neste ambiente são desejáveis, uma vez que essa característica reflete a capacidade saprofítica e, conseqüentemente, o estabelecimento desses micro-organismos no solo.





## 5 CONCLUSÕES

Populações de beta-rizóbios de nódulos de feijão-caupi e nativos de solo sob vegetação de caatinga densa é tão representativa quanto a de alfa-rizóbios.

Populações de alfa e beta-rizóbios estabelecidas em solos do Semiárido de Pernambuco apresentam perfis genético muito diverso com indivíduos potencialmente ainda não descritos.

Rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos sob vegetação de caatinga densa são muito diversos quanto aos aspectos bioquímicos relacionados a promoção de crescimento vegetal.

## 6 REFERÊNCIAS

- AAFI, N. E.; SAIDI, N.; MALTOUF, A. F.; PEREZ-PALACIOS, P.; DARY, M.; BRHADA, F.; PAJUELO, E. Prospecting metal-tolerant rhizobia for phytoremediation of mining soils from Morocco using *Anthyllis vulneraria* L. **Environmental Science and Pollution Research**, Bordéus, v. 22, p. 4500–4512, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3596-y>>.
- ABDELNABY, M.; ELNESAIRY, N. N. B.; MOHAMED, S. H.; ALKHAYALI, Y. A. A. Symbiotic and Phenotypic Characteristics of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Grown in Arid Region of Libya (Fezzan). **Journal of Environmental Science and Engineering B**, Clarkstown, v. 4, p. 227-239, 2015. Disponível em: <DOI: 10.17265/2162-5263/2015.05.001>.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão caupi. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, p. 1-9, 2014. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902014000100001>>.
- ALMEIDA, A. L. G. ALCÂNTARA, R. M. C. M. DE; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. da. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010. Disponível em: <DOI:10.5039/agraria.v5i3a795>.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)>.
- ALVES, J. J. A. Geocologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro. **Revista Climatologia e Estudos da Paisagem**, Rio Claro, v. 2, n. 1, p. 58-71, 2007.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.
- ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G. Engenharia genética: princípios e aplicações. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília: IPA/Embrapa, 2010. p. 437-468.
- ANDREWS, M.; MEYER, S. de; JAMES, E. K.; STEPKOWSKI, T.; HODGE, S.; SIMON, M. F.; YOUNG, J. P. W. Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial Genera : Occurrence. **Genes**, York, v.9, p.1-24, 2018. Disponível em: <[doi:10.3390/genes9070321](https://doi.org/10.3390/genes9070321)>.
- APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. Banco de dados LPN. Disponível em: <[www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

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

ARAÚJO FILHO, J. C.; BURGOS, N.; LOPES, O. F.; SILVA, F. H. B. B.; MEDEIROS, L. A. R.; MELO FILHO, H. F. R.; PARAHYBA, R. B. V.; CAVALCANTI, A. C.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SILVA, F. B. R.; LEITE, A. P.; SANTOS, J. C. P.; SOUSA NETO, N. C.; SILVA, A. B.; LUZ, L. R. Q. P.; LIMA, P. C.; REIS, R. M. G.; BARROS, A. H. C. **Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2000. 378 p. (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa, 11).

ARAÚJO, C. S. F.; SOUSA, A. N. Estudo do processo de desertificação na caatinga: uma proposta de educação ambiental. **Ciência & Educação**, Bauru, v.17, n.4, p. 975-986, 2011.

ARAÚJO, L. V. C.; SILVA, J. A. Unidade experimental Fazenda Belo Horizonte - Mossoró/RN. In: GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. 2. ed. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. p. 205-213.

ARORA, N. K., VERMA, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, Brisbane, v. 7: 381, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>>.

BAKHOUM, N.; ROUX, C. L.; DIOUF, D.; KANE, A.; NDOYE, F.; FALL, D.; DUPONNOIS, R.; NOBA, K.; SYLLA, S. N.; GALIANA, A. Distribution and Diversity of Rhizobial Populations Associated with *Acacia senegal* (L.) Willd. Provenances in Senegalese Arid and Semiarid Regions. **Open Journal of Forestry**, Tomsk, v. 4, n. 2, p. 136-143, 2014. <<http://dx.doi.org/10.4236/ojf.2014.42019>>.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDOTTO, L. E. B.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae). In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B., (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v. 6, p. 203-271.

BARAÚNA, A. C.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; REIS JUNIOR, F. B. DOS; IANNETTA, P. P.; MALUK, M.; GOI, S. R.; REIS, V. M.; JAMES, E. K.; ZILLI, J. E. *Rhizobium altiplani* sp. nov. isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in Central Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 66, p. 4118-4124, 2016. Disponível em: <[doi:10.1099/ijsem.0.002144](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002144)>.

BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. (Eds.). **Biotecnologia aplicada à agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. p. 191-221.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. D. 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**, Washington, v. 73, n. 8, p. 2635–2643, 2007. Disponível em: <doi:10.1128/AEM.01823-06>.

BASTOS, V. J.; MELO, D. A.; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; SILVA, P. M. C.; TEIXEIRA JUNIOR, D. L. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi submetido a diferentes manejos da vegetação natural na savana de Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, Monte Cristo, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v6i2.851 >.

BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiology Research Journal**, Beijing, v. 4, n. 6, p. 616 –639, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.

BERGE, O.; LODHI, A.; BRANDELET, G.; SANTAELLA, C.; RONCATO, M. A.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rhizobium alamii* sp. nov., na exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 59, p. 367–372. 2009. Disponível em: <doi:10.1099/ijs.0.000521-0>.

BEZERRA, M. J. M.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; SANTOS, P. R. A.; FEITOSA, E. O.; SILVA, L. S. Desempenho agrônômico de cultivares crioulos do feijão caupi para a região do cariri cearense. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, Fortaleza, v. 11, n. 7, p. 2022 - 2030, 2017. Disponível em: <DOI:10.7127/rbai.v11n700673>.

BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. de S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 657-671, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000300001>.

BONTEMPS, C., ELLIOTT, G., SIMON, M. F., REIS JUNIOR, F. B., GROSS, E., LAWTON, R. C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, Austin, v. 19, p. 44-52, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>.

BORGES, W. L.; PRIN, Y.; DUCOUSSO, M.; LE ROUX, C.; FARIA, S. M. de Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 314–321, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.009>.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 716 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Registro Nacional de Cultivares - RNC. **CultivarWeb**. Disponível em: <<http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb>>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da república Federativa do Brasil, 25 mar, Seção 1. Brasília: MAPA, 2011. p. 3-7. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. Acesso em 07 de fevereiro de 2019.

BRITO, M. de M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. D. da. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 206-215, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000100027>>.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; VENEGAS, V. H. A.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CARDOSO, D. B. O. S.; QUEIROZ, L. P. Diversidade de leguminosae nas caatingas de tucano, Bahia: implicações para a fitogeografia do Semiárido do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 2, p. 379-391, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860200758212>>.

CASSETARI, A. S.; SILVA, M. C. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. cap. 8, p.111-131.

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

CASTRO, J. L.; SOUZA, M. G.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A. A.; RODRIGUES, T. L.; MOREIRA, F. M. S. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, p. 1-20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbcs20160525>>.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. DE; CASTRO, H. G. DE; CORNELIO, G. D. L.; SANTOS, G. R. DOS; CHAGAS, L. F. B. COSTA, J. D. L. Isolation and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate cowpea in the Cerrado in Tocantins State, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3: p. 249-259, 2013.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 812-817, 2009.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, N. A. Phenotypic characterization of rhizobia strains isolated from Amazonian soils and symbiotic efficiency in cowpea. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 161-169, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.90010.4025/actasciagron.v32i1.900>>.

CHAVES, J. S.; OLIVEIRA, G. A.; RODRIGUES, T. G.; MAIA, S. S.; TEIXEIRA JÚNIOR, D. L.; SOUZA, F. G.; RODRIGUEZ, C. A. Produtividade do feijão-caupi sob inoculação em área alterada no Estado de Roraima – Brasil. **Nucleus**, Ituverava, v. 15, n. 2, p. 319-324, 2018. Disponível em: <DOI:10.3738/1982.2278.2814>.

CHEN, W. H.; YANG, S. H.; LI, Z. H.; ZHANG, X. X.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. X.; CHEN, W. F. *Ensifer shofinae* sp. nov., a novel rhizobial species isolated from root nodules of soybean (*Glycine max*). **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, 40, 144–149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.002>.

CONAB - Companhia Brasileira de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Safra 2018/19, Quarto Levantamento, Brasília: Conab, v. 6, n. 4, p.1-158, 2019.

CORDEIRO, A. B.; RIBEIRO, R. A.; HELENE, L. C. F.; HUNGRIA, M. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 67, p. 3937–3945, 2017. Disponível em: <doi:10.1099/ijsem.0.002225>.

CORDEIRO, L. Fixação do nitrogênio. In: GUERBAUY, G. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro, RJ, p.76-93, 2004.

COSTA, E. M., NÓBREGA, R. S. A., SILVA, A. F. T., FERREIRA, L. M. V., NÓBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v9i4a3590>.

COSTA, E. M.; GUIMARÃES, A. A.; VICENTIN, R. P.; RIBEIRO, P. R. A.; LEÃO, A. C. R.; BALSANELLI, E.; LEBBE, L.; AERTS, M.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. *S. Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 199, p. 1211–1221, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1390-1>.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de; 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**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; FERREIRA, L. V. M.; AMARAL, F. H. C.; NÓBREGA, J. C. A.; SILVA, A. F. T.; MOREIRA, F. M. S. Growth and yield of the cowpea cultivar BRS Guariba inoculated with rhizobia strains in Southwest Piauí. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 3073–3084, 2014a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p3073>.

COSTA, G. M.; CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A. Variações locais na riqueza florística em duas ecorregiões de caatinga. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 685-709, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566303>.

- DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C., FARIA, S. M. de; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 1-15, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>>.
- DALL'AGNOL, R. F.; PLOTTEGHER, F.; SOUZA, R. C.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. DOS; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 92, n. 8, p. 1-14, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw108>>.
- DALL'AGNOL, R. F. **Taxonomia e filogenia de alfa e beta-rizóbios provenientes de solos dos cerrados e da Mata Atlântica**. 2016. 217 f.: il. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 3222-3229, 2014. Disponível em: <doi: 10.1099/ijs.0.064543-0>.
- DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 63, p. 4167-4173, 2013. Disponível em: <doi: 10.1099/ijs.0.052928-0>.
- DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F.; VENEGAS, V.H.A.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Eds). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 91-32.
- DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; ATARO, Z.; FIKRE, A.; AMEDE, T.; DHOLE, A.; SHELAT, H.; VYAS, R.; JHALA, Y.; BHANGE, M. Endophytic occupation of legume root nodules by nifH-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Microbiology**, Milan, v. 66, n. 4, p. 1397-1407, 2016.
- DLUDLU, M. N.; CHIMPHANGO, S. B. M.; STIRTON, C. H.; MUASYA, A. M. Differential Preference of *Burkholderia* and *Mesorhizobium* to pH and Soil Types in the Core Cape Subregion, South Africa. **Genes**, York, v. 9, p. 1-13, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes9010002>>.
- DLUDLU, M. N.; CHIMPHANGO, S. B. M.; WALKER, G.; STIRTON, C. H.; MUASYA, A. M. Horizontal gene transfer among rhizobia of the Core Cape Subregion of southern Africa. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 118, p. 342-352, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.406>>.

EFROSE, R. C.; ROSU, C. M.; STEDEL, C.; STEFAN, A.; SIRBU, C.; GORGAN, L. D.; LABROU, N. E.; FLEMETAKIS, E. Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 111, n. 1, 135–153, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10482-017-0934-3>>.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W-M.; BONTEMPS, C.; CHOU, J-H.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, 1403–1411, 2007a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/aob/mcm227>>.

ELLIOTT, G. N.; CHOU, J. H.; CHEN, W. M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; ROMERO, E. M.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 762-778, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01799.x>>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2017. 574p.

ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; PALMER, M.; BEUKES, C.; STEENKAMP, E. T.; BRISCOE, L.; ID, N. K.; MALUK, M.; LAFOS, M.; HUMM, E.; ARRABIT, M.; CROOK, M.; ID, E. G.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; WHITMAN, W. B.; SHAPIRO, N.; POOLE, P. S.; HIRSCH, A. M.; VENTER, S. N.; JAMES, E. K. Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia sensu lato* Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae. **Genes**, York, v. 9, p. 1-23, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes9080389>>.

ESTRELLA, M. J.; MUNOZ, S.; SOTO, M. J.; RUIZ, O.; SANJUÁN, J. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1088-1098, 2009.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. **Crops**. 2017. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; BARBOZA, J. A. C.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).

FERREIRA, E. P. B.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; ARAÚJO, J. L. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; ARAÚJO, A. P. Contribuições para melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. In: ARAÚJO, A.P.; ALVES, B.J.R (Eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. v. 8, p. 251-291.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. de. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, 1983.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi**: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 5, p. 117-126, 1999.

FREITAS, A. D. S.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. M.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M. C. C. P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v.8, n. 8, p.788-796, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6518>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **Journal of Arid Environments**, Trelew, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, B. L. R.; CORTEZ, J. S. A.; MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 94, p. 181-192, 2012b. Disponível em: <DOI: 10.1007 / s10705-012-9545-6>.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 45, p. 109-114, 2012a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.017>>.

GILBERT, L. B.; HEEB, P.; GRIS, C.; TIMMERS, T.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. Experimental Evolution of a Plant Pathogen into a Legume Symbiont. **PLoS Biology**, San Francisco, v.8, n. 1, p. e1000280, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000280>>.

GHOSH, P. K.; KUMAR DE, T.; MAITI, T. K. Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. **Journal of Botany**, London, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/575067>>.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>>.

GRANADA, C. E.; BENEDUZI, A.; LISBOA, B. B.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. P. Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albus* plants growing in arenized and non-arenized areas. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 38, p. 323–329, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.009>>.

GRONEMEYER, J. L.; HUREK, T.; BUNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 66, p. 62–69, 2016. Disponível em: <DOI:10.1099/ijsem.0.000674>.

GRONEMEYER, J. L.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 65, p. 4886–4894, 2015. Disponível em: <DOI 10.1099/ijsem.0.000666>.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Agronomic efficiency of rhizobia strains in cowpea cultivated in the Pre-Amazon region, in Maranhão state. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 303–308, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000300011>>.

GUERROUJ, K.; RUÍZ-DÍEZ, B.; CHAHBOUNE, R.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; ABDELMOUMEN, H.; QUIÑONES, M. A.; IDRISI, M. M. EL; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; BEDMAR, E. J.; PEIX, A. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 218–223, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.001>>.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORESTINO, 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**, Washington, v.78, p. 6726–6733, 2012. Disponível em: <DOI:10.1128/AEM.01303-12>.

GUSMÃO, L. F. P.; QUEIROZ, L. P.; QUIJANO, F. R. B.; JUNCÁ, F. A.; OLIVEIRA, R. P.; BASEIA, I. G. Caatinga: Diversidade na adversidade do Semiárido brasileiro. In: PEIXOTO, A. L.; LUZ, J. R. P.; BRITO, M. A. **Conhecendo a biodiversidade**. Brasília: MCTIC/CNPq/PPBio, 2016. p. 101-111.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343–357, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672004000300002>>.

HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGE, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 65, p. 4441–4448, 2015. Disponível em: <doi: 10.1099 / ijsem.0.000591>.

HOFFMANN, L. V. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. cap. 9, p.153-164.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 825-834, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>.

HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; MENDES, I. C.; CHUEIRE, L. M. O; RIBEIRO, R. A.; BATISTA, J. S. S.; MENNA, P.; DELAMUTA, J. R. M. Introdução, Estabelecimento e Adaptação de Bradirrizóbios Simbiontes da Soja em Solos Brasileiros. In: YAMADA-OGATTA, S.F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M.C.; NOGUEIRA, M.A. **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL, 2015. cap. 16, p. 243-261.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

ITAKURA, M.; SAEKI, K.; OMORI, H.; YOKOYAMA, T.; KANEKO, T.; TABATA, S.; OHWADA, T.; TAJIMA, S.; UCHIUMI, T.; HONNMA, K.; FUJITA, K.; IWATA, H.; SAEKI, Y.; HARA, Y.; IKEDA, S.; EDA, S.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other Bradyrhizobiaceae members. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 326–339, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.88>.

JENSEN, J. R. Elementos de interpretação visual de imagens. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Sensoriamento remoto do ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres**. São José dos Campos: Parêntese, 2009. p. 129-50.

KAPEMBWA, R.; MWEETWA, A. M.; NGULUBE, M.; YENGWE, J. Morphological and Biochemical Characterization of Soybean Nodulating Rhizobia Indigenous to Zambia. **Sustainable Agriculture Research**, Melbourne, v. 5, n. 3, p. 84-96, 2016. Disponível em: <DOI:10.5539/sar.v5n3p84>.

KIILL, L. H. P.; TERAQ, D.; ALVAREZ, I. A. **Plantas ornamentais da caatinga**. Brasília: Embrapa, 2013. 139 p.

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B.; ARAÚJO, A. P. Variability of nodulation traits in Andean and Mesoamerican common bean gene pools. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 4, p. 252-260, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000400005>.

KOSKEY, G.; SIMON, M. W.; KIMITI, J. M.; OMBORI, O.; MAINGI, J. M.; NJERU, E. M. Genetic characterization and diversity of *rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 968, p. 1-12, 2018. doi: Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00968>>.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. D. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, p. 67-82, 2004.

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**, London, v. 147, p. 981-93, 2001. Disponível em: <[doi:10.1099/00221287-147-4-981](https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981)>.

LEITE, J. **Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos**. 2015. 75 f. il. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

LEITE, J., SEIDO, S. L., PASSOS, S. R., XAVIER, G. R., RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1215-1226, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000500015>>.

LEITE, J.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. É. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 703-713, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.007>>.

LEMAIRE, B.; CAUWENBERGHE, J. VAN; CHIMPHANGO, S.; STIRTON, C.; HONNAY, O.; SMETS, E.; MUASYA, A. M. Recombination and horizontal transfer of nodulation and ACC deaminase (*acdS*) genes within *Alpha* - and *Betaproteobacteria* nodulating legumes of the Cape Fynbos biome. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsec/fiv118>>.

LIAO, C. F. H. Devarda's Alloy Method for Total Nitrogen Determination I. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 45, p. 852-855, 1981. Disponível em: <[doi:10.2136/sssaj1981.03615995004500050005x](https://doi.org/10.2136/sssaj1981.03615995004500050005x)>.

LIMA, B. G. **Caatinga: espécies lenhosas e herbáceas**. Mossoró: UFERSA, 2012. 316 p.

LIMA, J. E. S.; NASCENTE, A. S.; LEANDRO, W. M.; SILVEIRA, P. M. *Urochloa ruziziensis* responses to sources and doses of urea. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 5, p. 401-407, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n5p401-407>>.

LIMA-JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L. J. O.; GIONGO, V.; LIMA, R. L. F. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MENEZES, R. S. C. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n.102, p. 289-298, 2014.

LING, J.; WANG, H.; WU, P.; LI, T.; TANG, Y.; NASEER, N.; ZHENG, H.; MASSON-BOIVIN, C.; ZHONG, Z.; ZHU, J. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Illinois, v. 113, n. 48, p. 13875-13880, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1615121113>>.

LIU, X.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X.; ZAGAR, C.; XIA, L. G.; DONG, X.; WANG, Y. P. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 80, p. 417-426, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01310.x>>.

LORENSINI, F.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; CERINI, J. B.; LOURENZI, C. R.; DE CONTI, A.; TIECHER, T. L.; SCHAPANSKI, D. E. Disponibilidade de nitrogênio de fontes minerais e orgânicas aplicadas em um Argissolo cultivado com videira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61 n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200012>>.

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

MARCON, E. C.; ROMIO, S. C.; MACCARI, V. M.; KLEIN, C.; LÁJUS, C. R. Uso de diferentes fontes de nitrogênio na cultura da soja. **Revista Thema**, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 298-308, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15536/thema.14.2017.298-308.427>>.

MARINHO, R. C. N.; FERREIRA, L. V. M.; SILVA, A. F.; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A., FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, Campinas, v. 76, p. 273–281, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4499.003>>.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500009>>.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 58, p. 200–214, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65392-0>>.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERY, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 13, p. 3479–3483, 1992.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1005–1010, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00215-5)>.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “rizóbio”**. Seropédica: EMBRAPA: CNPAB, 1997. 14 p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico, 19).

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Amsterdam, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-003-0668-4>>.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; BASTOS, M. L. R.; VICENTIN, R. P.; LYRA, M. C. C. P.; FRACETTO, G. G. M. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, p. 459-469, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MASON, M. L. T.; TABING, B. L. C.; YAMAMOTO, A.; SAEKI, Y. Influence of flooding and soil properties on the genetic diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating bradyrhizobia in the Philippines. **Heliyon**, London, v. 4, n. 11, 1-21, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00921>>.

MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 458–466, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>>.

MENEZES, K. A. S.; NUNES, G. F. O.; SAMPAIO, A. A.; SILVA, A. F.; SOUZA, L. S. B.; GAVA, C. A. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the Caatinga dry forest (Northeastern Brazil). **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 39, n. 2, p. 222-233, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.19084/RCA15050>>.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 91, p. 832-43, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.01222-08>>.

MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; VAN WYK, B. E.; VANDAMME, P. A.; HOWIESON, J. G. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 1090–1095. 2014. Disponível em: <doi:10.1099/ijso.0.058602-0>.

MEYER, S. E.; BRISCOE, L.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; AGAPAKIS, C. M.; DE LOS SANTOS, P. E. DE; SESHADRI, R.; REEVE, W.; WEINSTOCK, G.; O'HARA, G.; HOWIESON, J. G.; HIRSCH, A. M. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Burlington, v. 29, n. 6, p. 609–619, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-16-0091-R>.

MOHAMMED, M.; JAISWAL, S.; DAKORA, F. Distribution and correlation between phylogeny and functional traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)-nodulating microsymbionts from Ghana and South Africa. **Scientific Reports**, London, v. 12, p. 1–19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36324-0>.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 201-213, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.010>.

NASCENTE, A. S.; MONDO, V. H. V.; GONZAGA, A. C. O.; CARVALHO, M. C. S.; LACERDA, M. C. Doses e épocas de aplicação foliar de N afetando a produtividade de grãos do feijoeiro comum. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 10, n. 37, p. 199-208, 2017.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 36-42, 2010. Disponível em: <DOI:10.5039/agraria.v5i1a575>.

NOCELLI, N.; BOGINO, P. C.; BANCHIO, E.; GIORDANO, W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. **Materials**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma9060418>.

NUNES, G. F. O.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, A. A.; LEITE, J.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; SEIDO, S. L.; ZILLI, J. E.; MARTINS, L. M. V. Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 612-624, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.19084/RCA17339>.

NDUNGU, S. M.; MESSMER, M. M.; ZIEGLER, D.; GAMPER, H. A.; MÉSZÁROS, E.; THUITA, M.; VANLAUWE, B.; FROSSARD, E.; THONAR, C. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Nanning, v. 261, p. 161–171, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.014>>.

OJIEWO, C. Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) growing in Ethiopia are nodulated by diverse rhizobia. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 12, n. 9, p. 200-217, 2018. Disponível em: <DOI:10.5897/AJMR2017.8756>.

OLIVEIRA, J. P.; SILVA, M. L. R. B.; LIRA, M. C. C. P.; BURITY, H. A. Fixação do N<sub>2</sub> associativa e em vida livre. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. cap. 4, p. 97-169.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 45, p. 106-113, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>>.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Eds.). **Advances in cowpea research**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture; Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1997. p. 1-12.

PAREYN, F. Dinâmica da regeneração da caatinga sob manejo florestal. In: SILVA, M. V.; MACEDO, A. J.; PAIVA, P. M. G.; CASSANDRA, L.; BAUMVOL, I. J. R. **A Caatinga e seu potencial Biotecnológica**. Recife: Editora da UFPE, 2013. p. 21-35.

PARKER, M.A.; ROUSTEAU, A. Mosaic origins of *Bradyrhizobium legume* symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 77, p. 110–115, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.011>>.

PÉREZ-YÉPEZ, J.; ARMAS-CAPOTE, N.; VELÁZQUEZ, E.; PÉREZ-GALDONA, R.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M. Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 553-559, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.003>>.

PIRES, R. C.; REIS JUNIOR, F. B. DOS; ZILLI, J. E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E. K.; SIMON, M. F. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 423, p. 411-428, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11104-017-3521-5>>.

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

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 914 p.

RADL, V.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 725-730, 2014. Disponível em: < DOI 10.1099/ij.s.0.053082-0>.

RADL, V.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in the semi-arid of Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 725-730, 2014. Disponível em: <doi:10.1099/ij.s.0.053082-0>.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; FLORES-FÉLIX, J. D.; CHAHBOUNE, R.; TORO, M.; VELÁZQUEZ, E.; PEIX, A. *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar centrosemae) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar phaseolarum) sp. nov. and a new symbiovar (tropici) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 378–383, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.06.001>.

REIS JÚNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. cap. 9, p.247-281.

REIS JÚNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>.

REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolados de diferentes espécies de *Brachiaria***. Documentos, Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 41 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 117).

REIS, V. M.; SCHWAB, S.; ROUWS, L. F. N.; TEIXEIRA, K. R. S. Diazotróficos associativos e de vida livre: avanços e aplicações biotecnológicas. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2010. cap. 2, p. 415-437.

RIBEIRO, M. R.; SAMPAIO, E. V. S. B.; GALINDO, I. C. L. Os solos e o processo de desertificação no semiárido brasileiro. In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R.B. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v. 6, p. 414-459.

RIBEIRO, P. R. A.; SANTOS, J. V. dos; COSTA, E. M. da; LEBBE, L.; ASSIS, E. S.; LOUZADA, M. O.; GUIMARÃES, A. A.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. de S. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Enschede, v. 212, p. 85–93, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.017>>.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 297–306, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.009>>.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LOPEZ, A. L.; ORRILLO, E. O.; BARCELLOS, F. G.; MARTINEZ, J.; THOMPSON, F. L.; ROMERO, E. M.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 62, p. 1180-1185, 2012. Disponível em: < doi: 10.1099/ijs.0.032912-0>.

RODRIGUES, D. R.; SILVA, A. F.; CAVALCANTI, M. I. P.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; RIBEIRO, P. R. A.; FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 503-512, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.007>>.

ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROMERO, E. M. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 34, p. 96–104, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>>.

SAÏDI, S.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; SANTILLANA, N.; ZÍÑIGA, D.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, E.; PEIX, A.; MHAMDI, R.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 242–247. 2014. Disponível em: <[doi:10.1099/ijs.0.052191-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.052191-0)>.

SAMPAIO, E. V. S. B. Características e potencialidades. In: GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. 2. ed. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. p. 29-42.

SANTOS, C. E. R. E. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; WARDSON, L. B.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, p. 249-256, 2007a.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação biológica de N<sub>2</sub> em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C.E.R.S. (Eds.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. Cap. 1, p. 17-42.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; BORGES, W. L.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; NASCIMENTO, L. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; BEZERRA, R. V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2007b.

SANTOS, E. M.; ALMEIDA, G. V. L.; OLIVEIRA, L. L. D. S. S.; MENESES, E. R. A.; GUEDES, M. V.; SACRAMENTO, A. C.; BEZERRA, G. S. C. L.; BRITO, J. V. A.; SANTOS, J. C. O Parque Estadual Mata da Pimenteira - Primeira Unidade de Conservação Estadual na Caatinga de Pernambuco. In: SANTOS, E. M.; MELO JÚNIOR, M.; CAVALCANTI, J. S. S.; ALMEIDA, G.V.L. **Parque estadual mata da pimenteira: riqueza natural e conservação da caatinga**. Recife: Editora da UFRPE, 2013. p. 15-26.

SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F.; FERREIRA, T. D. S.; DIAS, M. A. M.; FRAIZ, A. C. R.; ESCOBAR, I. E. C.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MORGANTE, C. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 121, p. 177–184, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.033>>.

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial *nodC* 537 sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.015>>.

SAWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 20, p. 282–285, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x>>.

SAYYED, R. Z.; JAMADAR, D. D.; PATEL, P. R. Production of exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp. **Indian Journal of Microbiology**, Delhi, v. 51, p. 294-300, 2011. Disponível em: <[doi:10.1007/s12088-011-0115-4](https://doi.org/10.1007/s12088-011-0115-4)>.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, Maryland, v. 160, p. 47–56, 1987.

SENA, P.T.S. **Caracterização polifásica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos sob diferentes usos agrícolas do semiárido baiano**. 2018. 73 f. il. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) - Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, 2018.

SHAMSELDIN, A. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation - review. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, Alexandria, v. 8, n. 4, p. 84-94, 2013. Disponível em: <[DOI:10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103](https://doi.org/10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103)>.

SHARMA, S. R.; RAO, N. K.; GOKHALE, T. S.; ISMAIL, S. Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Abu Dhabi, v. 25, p. 102-108, 2013. Disponível em: <[doi:10.9755/ejfa.v25i2.7590](https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i2.7590)>.

SHEU, S. Y.; HUANG, H. W.; YOUNG, C. C.; CHEN, W. M. *Rhizobium alvei* sp. nov., isolated from a freshwater river. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 65, n. 2, p. 472–478, 2015. <<http://doi.org/10.1099/ijms.0.065706-0>>.

SHETTA, N.D.; AL-SHAHARANI, T.S.; ABDEL-AAL, M. Identification and characterization of Rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. **American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences**, Amman, v. 10, n. 3, p. 410-418, 2011.

SHEU, S.-Y., CHOU, J.-H., BONTEMPS, C., ELLIOTT, G. N., GROSS, E., DOS REIS JUNIOR, F. B., MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; TIAGO, E. K.; SPRENT, J. I.; JOVEM, J. P. W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 63, 435–441, 2013. Disponível em: <[doi:10.1099/ijms.0.039859-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.039859-0)>.

SILVA JÚNIOR, E. B.; FAVERO, V. O.; XAVIER, G. R.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E. Rhizobium Inoculation of Cowpea in Brazilian Cerrado Increases Yields and Nitrogen Fixation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 110, p. 722–727, 2018. Disponível em: <[doi:10.2134/agronj2017.04.0231](https://doi.org/10.2134/agronj2017.04.0231)>.

SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA, K.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, P. J.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, p. 804-812, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014001000007>>.

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**, São Paulo, v. 43, p. 682–691, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200033>>.

SILVA, F. V.; DE MEYER, S. E.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BARBÉ, T. C.; XAVIER, G. R.; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; RUMJANEK, N. G.; WILLEMS, A.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazon rainforest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 2358–2363, 2014a. Disponível em: <[doi:10.1099/ijms.0.061259-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.061259-0)>.

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**, São Paulo, v. 43, p. 682–691, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000200033>>.

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

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.

SIQUEIRA FILHO, J. A. **Flora das caatingas do rio São Francisco: história natural e conservação**. 1.ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson; Petrolina: UNIVASF, 2012. 552 p.  
SMARTT, J. **Grain legumes: evolution and genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 333 p.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>>.

SOUZA, J. A.; BUZETTI, S.; TARSITANO, M. A. A.; VALDERRAMA, M. Corn costs and profitability as a function of source, rate and application time of nitrogen. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 321-329, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300005>>.

SOUZA, L. Q.; FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MOURA, P. M.; MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 1. Trees and shrubs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 94, p. 171-179, 2012b. Disponível em: <[doi:10.1007/s10705-012-9531-z](https://doi.org/10.1007/s10705-012-9531-z)>.

SPIPKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; DOWSON, C. G.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J. J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 8, p. 2607-2610, 2009. Disponível em: <[doi:10.1128/JCM.00770-09](https://doi.org/10.1128/JCM.00770-09)>.

STEELE, W. M.; MEHRA, K.L. Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. **Advances in Legume Science**, Kew, Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens. 1908. p. 393-404.

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 483-494, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1078/072320203770865765>>.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7041-7052, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005>>.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Dorchester, v. 37, p. 1015-1026, 1984. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90436-7)>.

SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Illinois, v. 95, n. 9, p. 5145–5149, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5145>>.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 12-22, 1982.

TAMPAKAKI, A. P.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 179-189, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001>>.

TAMPAKAKI, A.; 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**, London, v. 97, p. 4314–4325, 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jsfa.8281>>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013. Disponível em: <[doi:10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197)>.

TAN, H. W.; WEIR, B. S.; CARTER, N.; HEENAN, P. B.; RIDGWAY, H. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; ANDREWS, M. Rhizobia with 16S rRNA and *nifH* Similar to *Mesorhizobium huakuii* but Novel *recA*, *glnII*, *nodA* and *nodC* Genes Are Symbionts of New Zealand *Carmichaelinae*. **PLOS ONE**, Fürth, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047677>>.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 201-208, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100029>>.

TEIXEIRA, F. C. P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the <sup>15</sup>N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1989-1993, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.013>>.

TEJERIZO, G. T.; DEL PAPA, M. F.; DRAGHI, W.; LOZANO, M.; GIUSTI, M. DE L.; MARTINI, C.; SALAS, M. E.; SALTO, I.; WIBBERG, D.; SZCZEPANOWSKI, R.; WEIDNER, S.; SCHLÜTER, A.; LAGARES, A.; PISTORIO, M. First genomic analysis of the broad-host-range Rhizobium sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like Rhizobium sp. group. **Journal of Biotechnology**, Calgary, v. 155, n. 1, p. 3–10, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.011>>.

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J. Adubação nitrogenada e sustentabilidade de agroecossistemas. In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R.B. **Tópico em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011. v. 7, p. 193-220.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERBSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VAN-GESTEL, M.; LADD, J. N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 313-322, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90185-M](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90185-M)>.

VASCONCELOS, D. V.; AZEVEDO, B. M.; FERNANDES, C. N. V.; PINTO, O. R. O.; VIANA, T. V. A.; MESQUITA, J. B. R. Métodos de aplicação e doses de nitrogênio para a cultura do girassol. **IRRIGA**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 667-679, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.15809/irriga.2015v20n4p667>>.

VERDCOURT, B. Studies in the leguminosae: papilionoideae for the 'Flora of tropical East Africa'. **Kew Bulletin**, London, v. 24, n. 3, p. 507-569, 1970. Disponível em: <DOI:10.2307/4102859>.

VIEIRA, C. L.; FREITAS, A. D.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V.; ARAÚJO, M. S. Inoculação de variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p. 1170–1175, 2010.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970. 164 p.

WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: Plant host interaction. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 189, n. 5, p. 525–530, 2008. Disponível em: <doi:10.1007/s00203-007-0345-3>.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIE, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 97-703, 1991. Disponível em: <DOI:10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>>.

XU, K. W.; ZOU, L.; PENTTINEN, P.; WANG, K.; HENG, N. N.; ZHANG, X. P.; CHEN, Q.; ZHAO, K.; CHEN, Y. X. Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas, China. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 38, p. 515–523, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.009>>.

YAHDJIAN, L.; GHERARDI, L.; SALA, O. E. Nitrogen limitation in arid-subhumid ecosystems: a meta-analysis of fertilization studies. **Journal of Arid Environments**, Trelew, v. 75, p. 675-680, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.03.003>>.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.

ZAGO, L. F.; LIMA, C. R.; CRUZ, R. M. S.; ALBERTON, O. Inoculação de diferentes doses de *Bradyrhizobium* por cobertura e seu efeito na cultura da soja. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 21, n. 2, p. 65-69, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.25110/arqvet.v21i2.2018.7302>>.

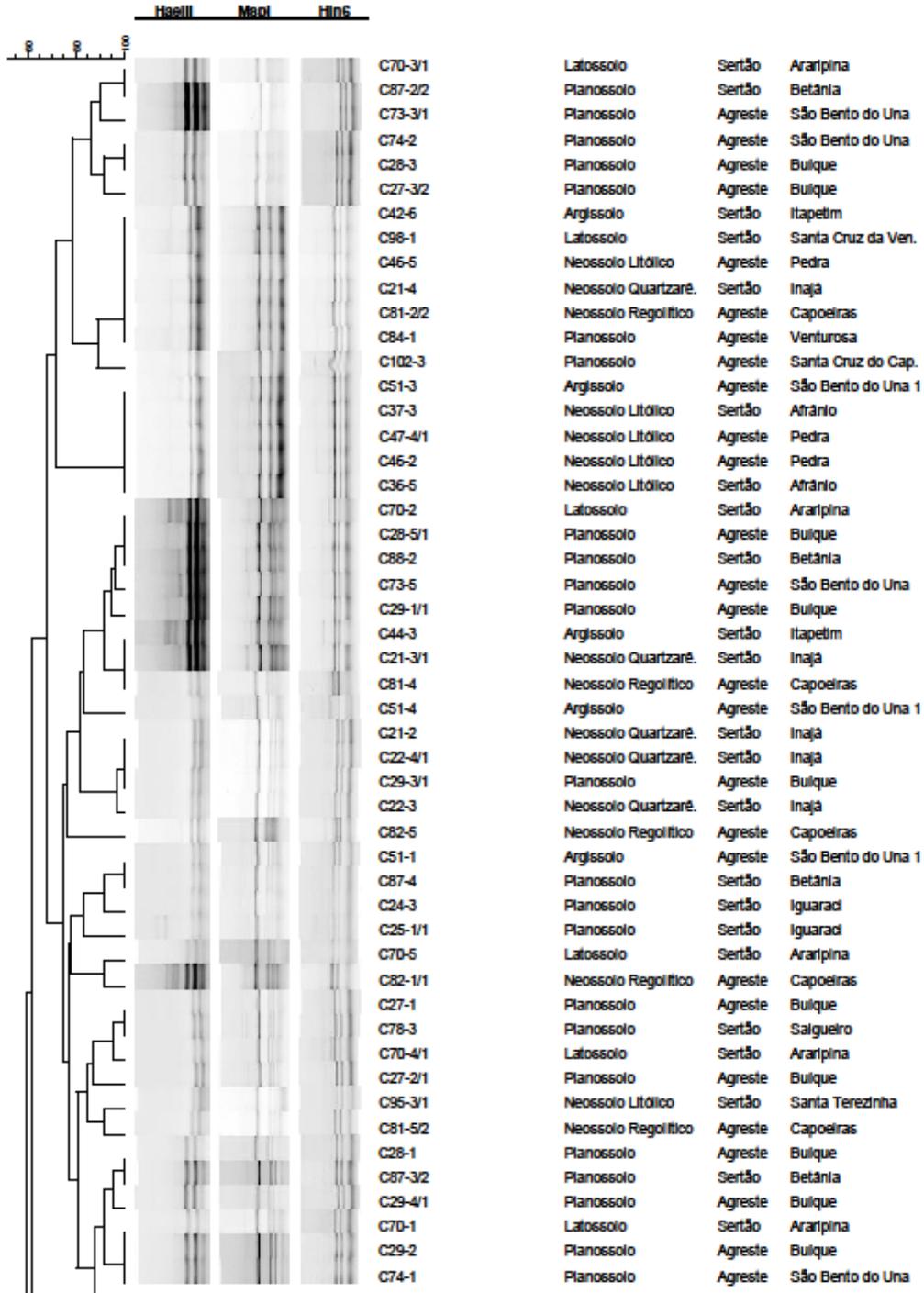
ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. et al. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566411>>.

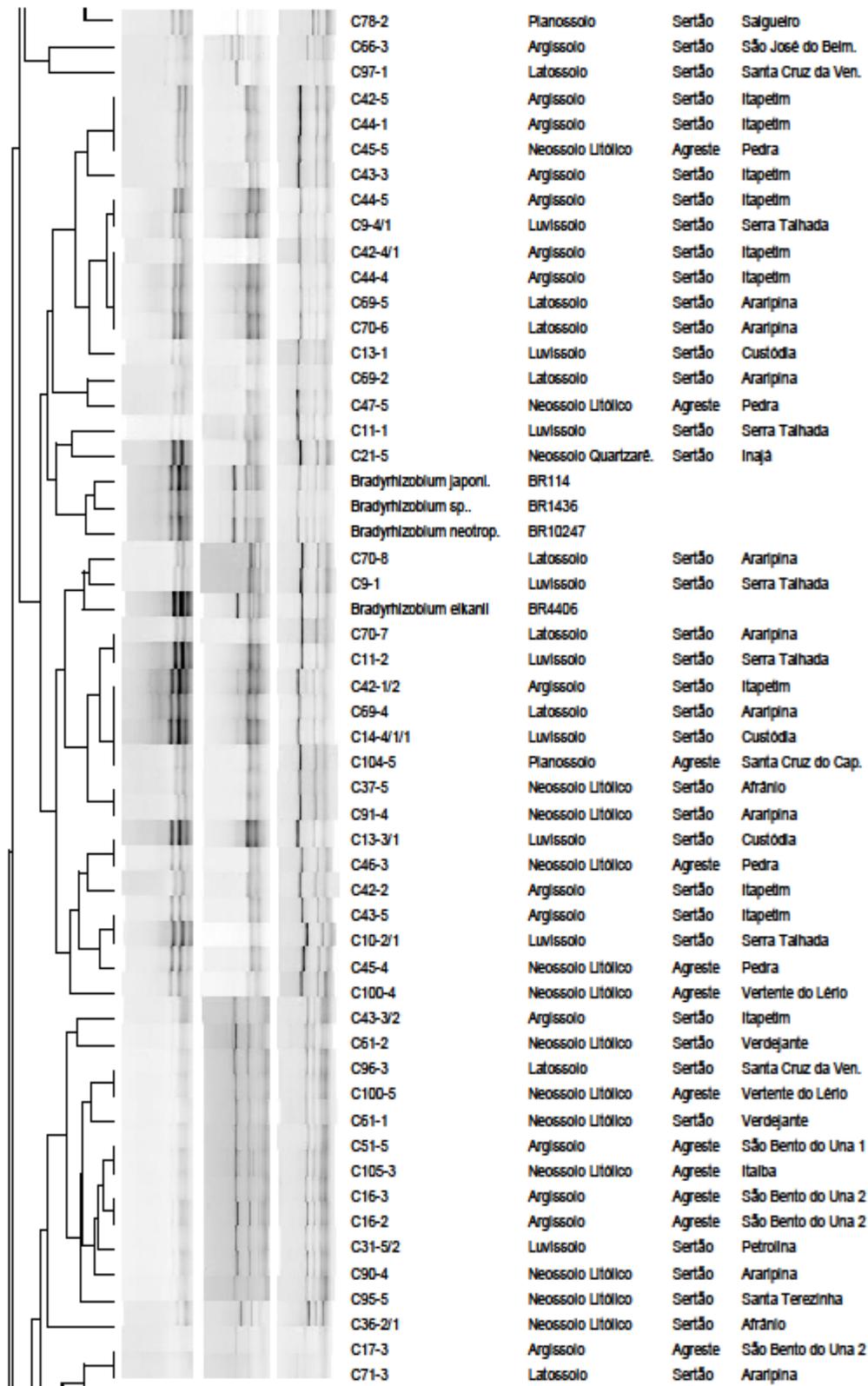
ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 4, p. 749-758, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672009000400003>>.

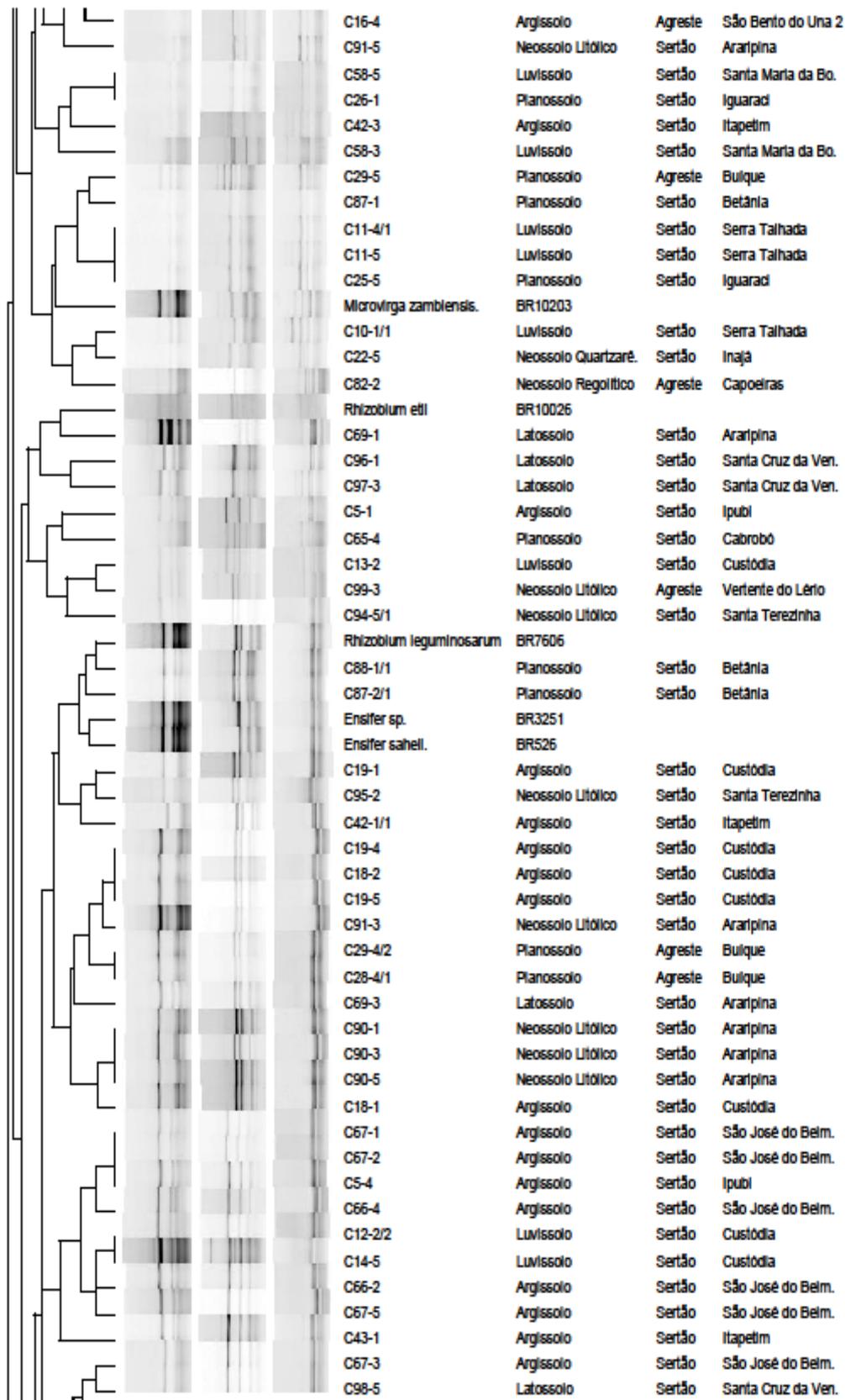
ZILLI, J. É.; SILVA NETO, M. L.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 739-742, 2011. Disponível em: <[DOI:10.1590/S0100-06832011000300009](https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300009)>.

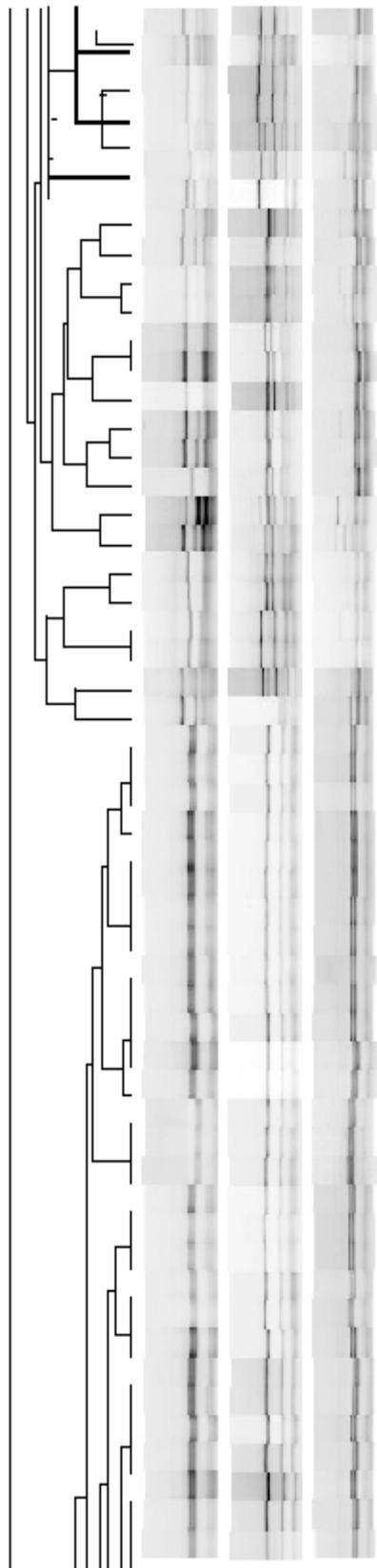
ZILLI, J.; BARAÚNA, A. C.; SILVA, K.; MEYER, S. E.; FARIAS, E. D. N. C.; KAMINSKI, P.; COSTA, I. B.; ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; CAMACHO, N. N.; DOURADO, F. D. S.; O'HARA, G. *Bradyrhizobium neotropica* sp. nov. isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, p. 3950-3957, 2014. Disponível em: <[doi:10.1099/ijs.0.065458-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.065458-0)>.

**APÊNDICE A** – Dendrograma de similaridade genética de rizóbios de feijão-caupi gerado a partir do padrão de bandas da restrição do 16S rRNA digerido com as enzimas *Hae*III, *Msp*I e *Hin*6I. Dendrograma construído utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

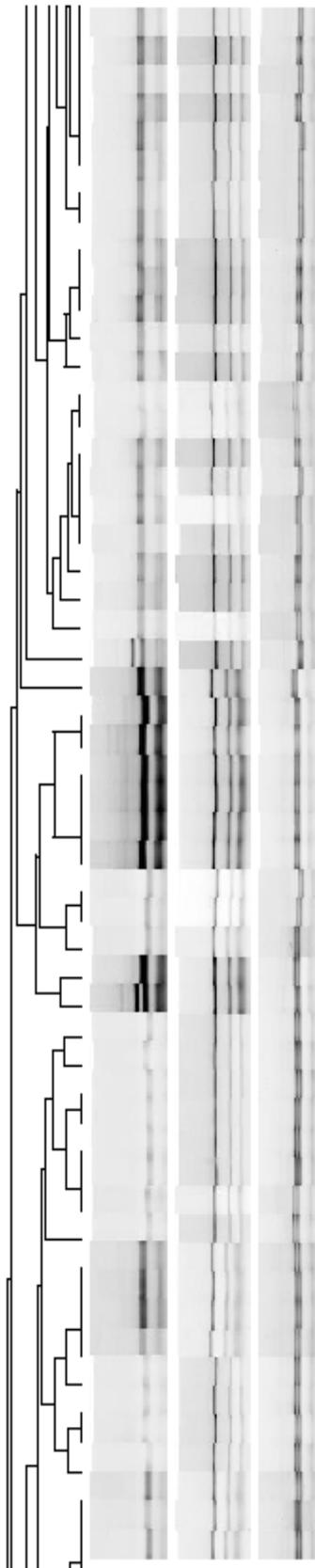




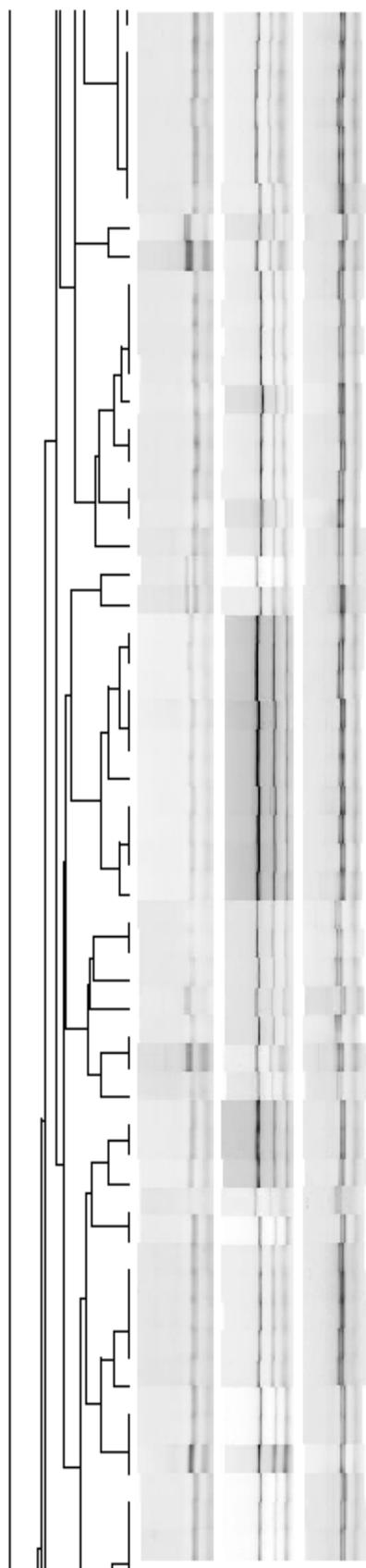




C66-1	Argissolo	Sertão	São José do Belm.
C14-4/2	Luvissolo	Sertão	Custódia
C5-3	Argissolo	Sertão	Ipubi
C25-2/1	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C12-5/2	Luvissolo	Sertão	Custódia
C66-5	Argissolo	Sertão	São José do Belm.
C42-4/2	Argissolo	Sertão	Itapetim
C97-5	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C97-4	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C97-2	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C96-5	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C43-4	Argissolo	Sertão	Itapetim
C27-3/1	Planossolo	Agreste	Bulque
C18-5	Argissolo	Sertão	Custódia
C98-3	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C104-3	Planossolo	Agreste	Santa Cruz do Cap.
C29-1/2	Planossolo	Agreste	Bulque
<i>Azotizobium caulinoda</i> .	BRS410		
<i>Ochrobactrum lupini</i> .	BR9078		
C19-3	Argissolo	Sertão	Custódia
C33-4/2	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C11-4/2	Luvissolo	Sertão	Serra Talhada
C29-3/2	Planossolo	Agreste	Bulque
C12-4/2	Luvissolo	Sertão	Custódia
C47-2	Neossolo Litólico	Agreste	Pedra
C51-2	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C20-5	Argissolo	Sertão	Custódia
C37-2	Neossolo Litólico	Sertão	Atrânio
C59-3	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C58-2	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C62-4	Neossolo Litólico	Sertão	Vendejante
C57-4	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C9-5	Luvissolo	Sertão	Serra Talhada
C31-4	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C30-2	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C77-1	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C12-1	Luvissolo	Sertão	Custódia
C94-5/2	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C31-2	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C75-1	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C54-2	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C59-5	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C38-1	Neossolo Litólico	Sertão	Atrânio
C94-3	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C53-4	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C16-1	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2
C56-4	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C30-5	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C54-5	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C32-4	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C56-5	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C44-2	Argissolo	Sertão	Itapetim
C25-3	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C71-2	Latossolo	Sertão	Araripe



C77-3	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C12-3	Luvissolo	Sertão	Custódia
C99-1	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C99-2	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C61-3	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C33-1	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C77-2	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C100-3	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C13-5	Luvissolo	Sertão	Custódia
C62-1	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C55-1	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C77-5	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C31-5/1	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C99-4	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C55-4	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C53-5	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C65-1	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C67-4	Argissolo	Sertão	São José do Belm.
C32-1	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C63-5	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C58-4	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C57-5	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C35-3	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C92-4	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C99-5	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C65-5/1	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C14-3	Luvissolo	Sertão	Custódia
C14-4/1/2	Luvissolo	Sertão	Custódia
C64-5	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C65-5/2	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C98-4	Latossolo	Sertão	Santa Cruz da Ven.
C14-2	Luvissolo	Sertão	Custódia
C92-1	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C25-4	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C33-4/1	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C30-4	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C64-4	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C31-3	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C76-2	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C15-2	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2
C12-2/1	Luvissolo	Sertão	Custódia
C56-2	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C75-4	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C52-3	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C32-3	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C56-1	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C26-4	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C24-1	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C37-4	Neossolo Litólico	Sertão	Afrânio
C63-1	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C63-4	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C57-2	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C64-1	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C62-3	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante



C38-2	Neossolo Litólico	Sertão	Afrânio
C17-2	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2
C76-5	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C58-1	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C90-2	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C84-4	Planossolo	Agreste	Venturosa
C84-2	Planossolo	Agreste	Venturosa
C77-4	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C95-1	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C18-3	Argissolo	Sertão	Custódia
C75-5	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C91-2	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C100-2	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C60-3	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C12-5/1	Luvissolo	Sertão	Custódia
C64-2	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C60-5	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C56-3	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C26-3	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C34-2	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C33-2	Planossolo	Sertão	Terra Nova
C65-2	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C84-5	Planossolo	Agreste	Venturosa
C53-6	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C59-1	Luvissolo	Sertão	Santa Maria da Bo.
C55-5	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C55-3	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C71-5	Latosolo	Sertão	Araripina
C63-3	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C62-2	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C21-1	Neossolo Quartzaré.	Sertão	Inajá
C53-2	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C75-3	Luvissolo	Sertão	São José do Egito
C60-1	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C15-3	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2
C31-1	Luvissolo	Sertão	Petrolina
C94-4	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C38-3	Neossolo Litólico	Sertão	Afrânio
C12-4/1	Luvissolo	Sertão	Custódia
C100-1	Neossolo Litólico	Agreste	Vertente do Lério
C94-1	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C15-1	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2
C26-5	Planossolo	Sertão	Iguaraci
C53-1	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 1
C13-4	Luvissolo	Sertão	Custódia
C60-2	Neossolo Litólico	Sertão	Verdejante
C92-2	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C54-1	Neossolo Litólico	Sertão	São José do Egito
C94-2	Neossolo Litólico	Sertão	Santa Terezinha
C65-3	Planossolo	Sertão	Cabrobó
C91-1	Neossolo Litólico	Sertão	Araripina
C20-2	Argissolo	Sertão	Custódia
C20-3	Argissolo	Sertão	Custódia
C17-1	Argissolo	Agreste	São Bento do Una 2

