

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

LAYANE SILVA BARBOSA DE SOUZA

**BACTÉRIAS NATIVAS DE SOLOS DA CAATINGA EM SIMBIOSE
COM *Mimosa tenuiflora*: OCORRÊNCIA E POSICIONAMENTO
TAXONÔMICO**

Recife

2021

Layane Silva Barbosa de Souza
Bióloga

Bactérias nativas de solos da caatinga em simbiose com *mimosa tenuiflora*: ocorrência e posicionamento taxonômico

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 Doutora em Ciência do Solo

Orientadora:

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientador:

Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior

Recife
2021

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 Central, Recife-PE, Brasil

S729b Souza, Layane Silva Barbosa de
Bactérias nativas de solos da caatinga em simbiose com *Mimosa tenuiflora*: ocorrência e posicionamento taxonômico / Layane Silva Barbosa de Souza. – 2021.
77 f.: il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, BR-PE, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Micro-organismos do solo 2. Micro-organismos biotecnológicos
3. Bactérias 4. Caatinga 5. Jurema preta 6. Rizóbio 7. Simbiose I. Freitas,
Ana Dolores Santiago de, orient. II. Título

CDD 631.4

LAYANE SILVA BARBOSA DE SOUZA

**Bactérias nativas de solos da Caatinga em simbiose com *Mimosa tenuiflora*:
ocorrência e posicionamento taxonômico**

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 Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 31 de novembro de 2021

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

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Jakson Leite
Instituto Federal do Pará

Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior
Embrapa Cerrados

Professora Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Vanina Giselle Maguire
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Dedicatória

**A minha fonte de inspiração diária, meu príncipe Miguel e minha princesa
Maria, ainda sendo gerada.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e por me sustentar nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pais Valter e Elza, que lutaram e sempre incentivaram minha formação profissional. As minhas irmãs Layse e Larissa pelo apoio e confiança de sempre. Ao meu marido Francisco Ítalo pelo companheirismo, compreensão, paciência e amor dedicados a cada dia. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, por ceder toda estrutura necessária para a realização da pesquisa e ao meu coorientador Dr Paulo Ivan Fernandes Junior por sempre disponibilizar seu laboratório para as minhas atividades. A minha querida Orientadora Ana Dolores por ter feito parte da minha formação, pela disponibilidade e orientação durante todo Doutorado. As amigas que a ciência me deu, Valeria Borges e Marina Monteiro pela parceria e por todos os momentos descontraídos que tivemos durante essa jornada, vocês foram essenciais para realização desse trabalho!

Aos técnicos de Laboratório de Microbiologia do Solo, Viviane Siqueira e do Laboratório de Controle Biológico, Herbet Mouse pelas orientações e por sempre entender minhas solicitações. As amigas que a ciência me deu, Valeria Borges e Marina Monteiro pela parceria e por todos os momentos descontraídos que tivemos durante essa jornada, vocês foram essenciais para realização desse trabalho!

Ao Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio – GFBN da UFRPE que me acolheu tão bem.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação desde a Educação Infantil ao Doutorado, meu eterno agradecimento

A UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO e demais órgãos de fomento, pela oportunidade apoio na pós-graduação. Agradeço a todas as pessoas que passaram por minha vida, as quais contribuíram de forma direta ou indiretamente para minha formação. Aos demais amigos da pós-graduação, agradeço pela convivência e pelo apoio.

MUITO OBRIGADA

Bactérias nativas de solos da Caatinga em simbiose com *Mimosa tenuiflora*: ocorrência e posicionamento taxonômico

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o principal processo de aporte deste nutriente em ecossistemas naturais e em agricultura de baixa utilização de insumos. Além disso, a introdução de leguminosas arbóreas inoculadas com bactérias diazotróficas pode ser uma estratégia para aquisição de nitrogênio para recuperação de áreas degradadas. A jurema preta é uma leguminosa de ocorrência ampla em diversos fragmentos de caatinga, principalmente em áreas em regeneração da vegetação nativa. Essa espécie é capaz de formar nódulos e adquirir proporções consideráveis de sua nutrição nitrogenada por meio da simbiose com rizóbios. No entanto, ainda são poucas as informações sobre as especificidades da simbiose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência e o posicionamento taxonômico de microssimbiontes de jurema preta naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido pernambucano. 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 com as principais classes de solos ocorrentes no bioma: Argissolo, Neossolo Litólico, Neossolo Quartzarênico, Neossolo Regolítico, Latossolo, Luvisso e Planossolo. Para acessar a comunidade rizobiana dos solos foi realizado experimento em casa de vegetação utilizando jurema-preta como planta-isca. Dos nódulos coletados no experimento de planta-isca foram obtidos 391 isolados, em sua maioria de crescimento rápido, com metabolismo que acidifica o meio de cultura e produtores de muito muco. Como critério de autenticação do “status” de rizóbio dos isolados, foram avaliadas a habilidade de fixar nitrogênio e de formar nódulos, por meio da amplificação simultânea dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*, sendo selecionados 250 isolados positivos pelo método Duplex-PCR. A diversidade genética dos isolados foi avaliada pela Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) que permitiu a formação de dois grupos, dentro dos quais foram formados 29 subgrupos a 75% de similaridade. A partir desse agrupamento, foram selecionados 48 isolados para avaliação do perfil genético através do BOX PCR e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *gyrB*. Analisando a árvore com base nos 19 isolados com sequência de boa qualidade do gene 16S, verificou-se que os 19 isolados fazem parte da classe das betaproteobactérias pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*.

Palavras-chave: alfa-rizóbios; beta-rizóbios; Jurema preta.

Native bacteria from Caatinga soils in symbiosis with *Mimosa tenuiflora*: occurrence and taxonomic positioning

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (FBN) is the main input process for this nutrient in natural ecosystems and in low-input agriculture. Furthermore, the introduction of leguminous trees inoculated with diazotrophic bacteria can be a strategy for nitrogen acquisition to recover degraded areas. Jurema negra is a legume that occurs widely in several fragments of caatinga, mainly in areas undergoing regeneration of native vegetation. This species is capable of forming nodules and acquiring considerable proportions of its nitrogenous nutrition through symbiosis with rhizobia. However, there is still little information about the specifics of symbiosis. The objective of this work was to evaluate the occurrence, characteristics and diversity of microsymbionts of black jurema naturally established in soils in the semiarid region of Pernambuco. In order to carry out a representative sampling of the different edaphoclimatic conditions, points were selected in areas with dense caatinga coverage (with little anthropogenic interference) and with the main classes of soils occurring in the biome: Argisol, Litholic Neosol, Quartzarenic Neosol, Regolithic Neosol, Latosol, Luvisol and Planosol. To access the rhizobian community of the soils, an experiment was carried out in a greenhouse using black jurema as a bait plant. From the nodules collected in the bait-plant experiment, 391 isolates were obtained, most of them fast growing, with metabolism that acidifies the culture medium and producing a lot of mucus. As a criterion for authenticating the rhizobia status of the isolates, the ability to fix nitrogen and form nodules was evaluated by means of the simultaneous amplification of the symbiotic genes *nifH* and *nodC*, and 250 positive isolates were selected by the Duplex-PCR method. The genetic diversity of the isolates was evaluated by Restriction Analysis of Amplified Ribosomal DNA (ARDRA) which allowed the formation of two groups, within which 29 subgroups were formed at 75% similarity. From this grouping, 48 isolates were selected for evaluation of the genetic profile through BOX PCR and sequencing of 16S rRNA and *gyrB* genes. Analyzing the tree based on the 19 isolates with good quality 16S gene sequence, it was found that the 19 isolates belong to the class of betaproteobacteria belonging to the genus *Paraburkholderia*.

Keywords: alpha-rhizobia; beta-rhizobia; Jurema preta.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fragmentos de caatinga densa localizados no Semiárido pernambucano.25
- Figura 2** – Distribuição dos pontos de coleta de solo no Semiárido Pernambucano.27
- Figura 3** – Visão geral do experimento conduzido em casa de vegetação para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do Estado de Pernambuco, Brasil. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** – Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.) nativos de classes de solos do semiárido pernambucano em função do crescimento (A), pH(B), cor da colônia (C) e quantidade de muco (D). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** – Amplificação dos genes simbióticos *nodC* (650 pb) e *nifH* (360 pb) em rizóbios.45
- Figura 6** – Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de jurema preta cultivado em solos do Semiárido de Pernambuco. Enzimas: *AluI* (A), *HinfI* (B) e *HHaI* (C).47
- Figura 7** – Dendrograma de similaridade com base nos perfis polimórficos da técnica ARDRA usando 16S rRNA como o produto de PCR e endonucleases *AluI*, *HinfI* e *HHaI*. As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica), utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice.50
- Figura 8** – Análise de componentes principais entre os locais de coleta do solo em função dos padrões de grupos genotípicos gerados a partir dos perfis de ARDRA. .51
- Figura 9** – Agrupamento de perfis de BOX PCR dos isolados selecionados para sequenciamento.53
- Figura 10** – Análise da qualidade da sequência parcial do gene 16S da estirpe de *Paraburkholderia* sp. C35-3 por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 1097 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20).54
- Figura 11** – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base e sequencias parciais do gene 16S de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo

utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo estão em negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

.....57

Figura 12 – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base e sequencias parciais do gene *gyrB* de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo estão em negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

.....59

Figura 13 – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequencias concatenadas dos genes *gyrB* +16S de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo estão em negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.....61

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. .27	27
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.29	29
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, Brasil31	31
Tabela 4 – Diâmetro caulinar (DC), altura de plantas (ALT), número de folhas (NF), número de nódulos (NN), massa seca da parte aérea (MSPA) massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) de plantas de jurema preta (<i>Mimosa tenuiflora</i>) cultivadas em vasos contendo solo.....41	41
Tabela 5 – Identificação dos isolados de <i>Mimosa tenuiflora</i> por meio da comparação de sequências do gene <i>16S</i> e <i>gyrB</i> com as estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank.....63	63

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ARDRA- Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado

BOX – sequências repetitivas interespaçadas de DNA

DNA – ácido Desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

FBN – fixação biológica do nitrogênio

Kb – tamanho do fragmento de DNA por 1000 pares de base Método UPGMA – do inglês Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages é um simples método estatístico de agrupamento hierárquico

MLSA - Multilocus Sequencing Analysis

MSPA- Massa seca da parte aérea

MSR- Massa seca de raiz

MST- Massa seca total

MSN- Massa seca de nódulos

NN- Número de nódulos

NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information

pb – pares de bases, correspondentes ao comprimento do DNA

PCR – reação em cadeia da DNA polimerase

rpm – rotações por minuto

µl – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hipóteses	16
1.2 Objetivo geral	16
1.3 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Bioma Caatinga.....	17
2.2. As leguminosas na Caatinga.....	18
2.3 Fixação biológica do nitrogênio	19
2.4 Importância de leguminosas arbóreas na fixação biológica de N ₂	21
2.5 Técnicas moleculares utilizadas na avaliação da variabilidade genética de rizóbios, com ênfase nas técnicas utilizadas neste estudo	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Amostragem e caracterização físico-química dos solos.....	25
3.2 Experimento com planta-isca para a obtenção dos nódulos radiculares.....	32
3.3 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos.....	33
3.4 Caracterização genotípica.....	34
3.4.1 Extração de DNA.....	34
3.4.2 Amplificação de fragmentos de genes <i>nifH</i> e <i>nodC</i> - DUPLEX	35
3.4.3 Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)	36
3.4.4 Fingerprinting molecular por BOX-PCR.....	37
3.4.5 Sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>gyrB</i>	37
3.5 Análises estatísticas.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Obtenção dos isolados e caracterização fenotípica	43
4.2 Amplificação simultânea de fragmentos dos genes <i>nifH</i> e <i>nodC</i> como ferramenta para confirmação do status de rizóbio.....	44

4.3 Diversidade genética dos isolados de rizóbio utilizando ARDRA	46
4.4 BOX PCR	52
4.5. Sequenciamento do gene 16SrRNA	54
4.6 Sequenciamento dos genes constitutivos gyrB	58
5 CONCLUSÕES	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Na Caatinga, a ocorrência de uma grande diversidade de condições edafoclimáticas, associada à grande diversidade alfa e beta da vegetação, faz com que o Bioma seja um campo vasto para estudos sobre a ecologia de microorganismos.

A família Fabaceae é a terceira maior família botânica, estando catalogadas 19.327 espécies, distribuídas em 727 gêneros (LEWIS et al., 2005). Na Caatinga ocorrem 86 gêneros e 320 espécies, constituindo cerca de um terço da riqueza do bioma e com o maior número de espécies endêmicas (QUEIROZ, 2009).

A grande particularidade ecológica das leguminosas é a capacidade de formar nódulos em suas raízes e, menos frequentemente, nos caules, estruturas onde é realizada a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por meio da simbiose com bactérias diazotróficas. Em ecossistemas naturais esse processo é considerado a principal fonte de incorporação de nitrogênio ao solo. Diante da diversidade de espécies de leguminosas na Caatinga, trabalhos que estudam a simbiose entre rizóbios e espécies nativas ainda são escassos, prejudicando o conhecimento sobre o potencial de FBN em agroecossistemas do Semiárido.

A capacidade de nodular de diversas espécies nativas ainda não foi determinada e, diante da extensão e diversidade de condições edafoclimáticas do Bioma, pode-se dizer que ainda são pouco conhecidas as características, ocorrência e ecologia das populações dos microssimbiontes, assim como são escassas as informações sobre os potenciais de aporte de N em sistemas naturais. Essa grande lacuna de informação encobre uma provável ocorrência de bactérias simbióticas de espécies ainda não conhecidas pela comunidade científica e, também, dificulta o estabelecimento de práticas de manejo que permitam a exploração sustentável da vegetação nativa, bastante utilizada como fonte de lenha e pastagem.

No sistema de agricultura itinerante, sistema de produção predominante no Semiárido Nordeste, grandes áreas são abandonadas após sofrerem desmatamento, queima, cultivo e/ou superpastejo. Em áreas em regeneração da vegetação nativa, a jurema preta é a espécie arbórea de maior frequência e abundância, desempenhando um importante papel ecológico no Bioma. A compreensão da dinâmica da regeneração da vegetação nativa é fundamental para o manejo adequado destas áreas, mas poucos estudos têm sido feitos sobre este manejo. Sem dúvida, a regeneração da vegetação nativa depende, entre outros

fatores, do restabelecimento dos estoques iniciais de nutrientes, perdidos juntamente com a biomassa vegetal cortada e queimada. Dentre os nutrientes, o nitrogênio é o mais crítico para o crescimento da maioria das plantas em regiões áridas e semiáridas, podendo ser tão limitante quanto a água.

Além disso, a utilização de leguminosas nativas em sistemas de recuperação de áreas degradadas no Semiárido é de grande importância, por seu potencial de melhoria dos estoques de C e N por meio da simbiose com bactérias diazotróficas, capazes de colonizar ambientes empobrecidos em nitrogênio. A prática de inoculação em leguminosas nativas em áreas degradadas pode garantir um melhor estabelecimento das plantas em solos de fertilidade reduzida, representando uma estratégia para minimizar os impactos ambientais e aumentar a qualidade destes solos.

1.1 Hipóteses

Diferentes condições edafoclimáticas e de flora, estrutura e fisionomia da vegetação de caatinga condicionam a ocorrência, características e diversidade das populações de rizóbios capazes de formar simbiose com jurema preta.

A grande diversidade de condições edafoclimáticas e de tipos de caatinga fazem dos solos do Semiárido um repositório de espécies de rizóbios ainda não conhecidas na literatura.

1.2 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência, as características e a diversidade de bactérias naturalmente estabelecidas em solos representativos do Semiárido de Pernambuco capazes de nodular e fixar nitrogênio em simbiose com a jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.).

1.3 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência e caracterizar fenotípica e genotípicamente rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido de Pernambuco capazes de nodular a jurema- preta.
- Determinar a diversidade e a estrutura genética da coleção de rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido de Pernambuco.
- Identificar genótipos de microssimbiontes de jurema preta ainda não descritos na literatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioma Caatinga

O Semiárido brasileiro se estende por quase todos os estados da Região Nordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e parte do Norte de Minas Gerais, com precipitação média anual que varia de 500 a 800 mm, sendo que cerca de 11% da região recebe menos que 500 mm por ano (SILVA; LACHER, 2020). Além disso, o regime pluviométrico da região apresenta grande variabilidade espacial e interanual, aliada ao clima quente e seco, condicionando nessa região longos períodos de estiagem e de déficit hídrico para as plantas (GUSMÃO, 2016; SUDENE 2019)

Os solos encontrados na região semiárida apresentam grande variabilidade, resultado do clima, litologia e topografia bastante diversificadas. Nessa região são encontrados solos de origem geológica cristalina e de formações geológicas sedimentares (QUEIROZ, 2009). Das classes mais comuns presentes na região temos Neossolos (18,7%), Latossolos (17,1%), Argissolos (14,1%) e Luvisolos (12,8%). Segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2018), os solos que compõem a Caatinga podem ser divididos de acordo com a geomorfologia, sendo a depressão sertaneja uma das paisagens mais típicas do Bioma, com solos, em sua maioria, pouco desenvolvidos e com afloramentos rochosos (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO et al., 2009).

A Caatinga é o bioma exclusivamente brasileiro que cobre a maior parte da área com clima semiárido da região Nordeste do Brasil e que, em função das variações topográficas e climáticas, apresenta paisagens diferenciadas, com distintos padrões de distribuição de fisionomias e espécies de plantas (LIMA JÚNIOR et al., 2014). Isoladamente, cada levantamento local revela uma flora relativamente pobre, inferior a uma centena por hectare, mas o conjunto multiplica-se por causa das diferenças entre áreas. Esta observação conduz a consequência que nas caatingas a diversidade beta é alta, enquanto a alfa é baixa (SAMPAIO; FREITAS, 2017).

A vegetação é composta principalmente por espécies de fisionomias xerófitas, lenhosas, espinhosas, decíduas e semidecíduas, com uma predominância de árvores e arbustos e muitas dessas espécies apresentam características adaptativas às condições climáticas, tais como caducifolia, presença de espinhos, raízes bem desenvolvidas, entre outras (QUEIROZ, 2009; MAIA, 2012).

2.2. As leguminosas na Caatinga

Dentre as espécies vegetais naturalmente ocorrentes no bioma Caatinga, plantas da família das leguminosas (Fabaceae), possuem a maior diversidade e maior abundância dentre as angiospermas. Esse grupo de plantas possui a capacidade de nodular e realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios. Esta simbiose é considerada uma vantagem ecológica das leguminosas sobre outros grupos de plantas, visto que, quando a simbiose é eficiente, resulta no aporte de quantidades expressivas de nitrogênio para a nutrição da planta (FREITAS et al., 2012)

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).

Conhecida popularmente como jurema ou jurema preta, *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir é uma árvore perene e nativa do Semiárido do Nordeste brasileiro. Tem cerca de 5 a 7 m de altura, sua casca apresenta a cor castanho-escuro, grossa, rugosa, fendida longitudinalmente. Com ramificação abundante, possui folhas divididas, com 15 a 33 pares de folíolos brilhantes e espinhos. Possui inflorescência em espigas com flores brancas, muito pequenas. O fruto é uma vagem pequena (2,5 a 5 cm de comprimento), as sementes são pequenas, ovais, achatadas e de cor castanho-claro. É uma espécie com potencial forrageiro, medicinal e fundamental para a coleta apícola de néctar por algumas abelhas. Sua madeira é de excelente qualidade para a produção de lenha, carvão, mourões, estacas, bem como na fabricação de móveis rústicos (ARAÚJO FILHO, 2013; QUEIROZ, 2009).

Atualmente, o ecossistema da Caatinga encontra-se bastante degradado devido à atividade antrópica, com remoção de espécies nativas, a substituição de espécies vegetais nativas por espécies cultivadas, pastagens e construções civis. As queimadas e o desmatamento são práticas muito comuns no preparo da terra para agropecuária, em que o sistema de agricultura itinerante utilizando a prática do corte e queima da vegetação nativa ainda é bastante empregado. O desmatamento reduz significativamente a resistência e a resiliência dos ecossistemas alterados (CORREIA et al, 2009), sendo a principal causa para a diminuição e/ou perdas na diversidade da comunidade microbiana do solo (ALVES et al., 2007; SOARES; ALMEIDA, 2011).

Leguminosas arbóreas com potencial comprovado de FBN em simbiose com rizóbios, como a *M. tenuiflora*, têm potencial para serem utilizadas na recuperação de

áreas degradadas, visto que a FBN é considerada a principal via de entrada deste elemento em ambientes degradados e o fornecimento adequado deste elemento propicia o restabelecimento de outras espécies vegetais no solo (FREITAS et al., 2015).

Desta forma, ao garantir maiores aportes de N em áreas em regeneração, a utilização de insumos biológicos, como inoculação com rizóbios previamente selecionados por sua eficiência, representa uma alternativa na redução dos efeitos deletérios gerados pela degradação. Freitas et al. (2010) estimaram que a FBN em leguminosas arbóreas da Caatinga, entre elas a *M. tenuiflora* e *Mimosa arenosa* apresentam alto potencial de aporte de N, com contribuições médias que chegaram a 68% do N acumulado nas plantas sendo derivado da atmosfera, o que indica o elevado potencial destas plantas para serem utilizadas na região.

2.3 Fixação biológica do nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, ficando atrás apenas da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esse processo natural é realizado por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas, arqueas e cianobactérias. As bactérias simbióticas constituem o grupo mais importante, em termos de quantidades totais de nitrogênio fixado. As plantas da família Fabaceae, por sua vez, possuem o mecanismo mais eficiente entre as associações de vegetais com bactérias diazotróficas e essas conseguem a maior parte deste nutriente diretamente da atmosfera através da relação simbiótica com bactérias associadas às raízes das plantas (RAZA et al., 2020).

O processo de FBN simbiótico é o resultado de uma complexa comunicação molecular, que ocorre por sinais moleculares e da especificidade simbiótica, induzidos por diversas substâncias exsudadas pelas raízes da planta hospedeira que envolve a expressão de genes em ambos os parceiros simbióticos (PERRET et al., 2000; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Primeiramente, as raízes das leguminosas exsudam compostos fenólicos, chamados de flavonoides e isoflavonoides (ANDREWS; ANDREW, 2017). Ao perceber a presença de tais compostos, as bactérias ativam os genes da nodulação (*nod*) e induzem reações quimiostáticas que direcionam os rizóbios para as raízes. Após a ativação dos genes da nodulação, os rizóbios começam a sintetizar os fatores

nod, identificados como lipoquito-oligossacarídeos, que atuam como moléculas sinalizadoras induzindo a expressão gênica na planta hospedeira (PARNISKE, 2018)

Após o processo de exsudação e sinalização molecular, inicia-se o processo de colonização, com a adesão e multiplicação dos rizóbios ao redor dos pelos radiculares. Na sequência, o pelo se encurva envolvendo os rizóbios e, por meio da degradação de parte da parede celular do pelo, começa a se invaginar. Os rizóbios invadem o pelo radicular utilizando um tubo denominado de cordão de infecção. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando formando o nódulo primário. A partir do estabelecimento do nódulo definitivo, as bactérias, que se encontram dentro das células do córtex, param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias transformações bioquímicas até se transformarem em bacteroides, e então, tornam-se capazes de fixar N₂ em troca de compostos de carbono da planta (SANTOS et al., 2008).

Os rizóbios nativos de regiões áridas apresentam, em geral, capacidade de resistir às características peculiares da região, como o clima, o que tornam essas estirpes mais resistentes e competitivas (ZILLI et al., 2004). A introdução de estirpes autóctones eficientes pode garantir o fornecimento de nitrogênio e conseqüentemente alcançar uma produtividade satisfatória (SANTOS et al., 2008).

Diante da importância que esses micro-organismos representam para a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres, contribuições vêm sendo feitas no avanço do conhecimento da ecologia e diversidade de microsimbiontes em diferentes ecossistemas brasileiros, que contribuem com o enriquecimento da taxonomia de rizóbios. Descobertas de novas espécies de rizóbios descritas a partir de solos brasileiros apontam para um recurso ainda pouco explorado, tanto em termos de conhecimento (biodiversidade) com de aplicação biotecnológica (inoculantes microbianos). Recentemente, Paulitsch et al. (2019) estudaram a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa gymnas* e descreveram uma nova espécie a *Paraburkholderia quartelaensis* sp. nov nativa de solos do Paraná. Paulitsch et al. (2020) descreveram duas novas espécies isoladas de solos da Mata Atlântica brasileira, *Paraburkholderia atlantica* sp nov e *Paraburkholderia franconis* nov sp.

2.4 Importância de leguminosas arbóreas na fixação biológica de N₂

Historicamente, o bioma Caatinga vem sofrendo com a ausência de práticas sustentáveis na agricultura e pecuária. O desmatamento generalizado para implementação da agricultura, a extração insustentável dos recursos naturais, como lenha, mineração, pastoreio excessivo de caprinos e bovinos e a crescente urbanização da região, faz com que ocorra uma perda de biodiversidade. Em algumas áreas da Caatinga, o nível de degradação dos solos atingiu o estágio mais alto de degradação, resultando em processo de desertificação (SILVA; LACHER, 2020).

Em áreas em processo de degradação, o restabelecimento da fertilidade do solo é fundamental para criar condições adequadas para acelerar a recomposição vegetal. Logo, utilizar a gestão de FBN se torna uma estratégia promissora para o aumento da disponibilidade de nitrogênio criando condições que ajudem a estabelecer a saúde do solo (MUNROE; ISAAC, 2014).

Mesmo com tanta diversidade de espécies de leguminosas, poucas espécies nativas da caatinga foram estudadas quanto ao potencial simbiótico e às características de seus microssimbiontes (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2012; SOUZA et al., 2012; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015a; MENEZES et al., 2016).

Espécies de leguminosas nativas são promissoras para a utilização em sistemas de recuperação de áreas degradadas, isto porque essas plantas são mais adaptadas às condições climáticas da Caatinga (geralmente, temperaturas altas e baixa disponibilidade hídrica), desenvolvendo respostas às situações de estresse, o que lhes permite prosperar sob condições normalmente desfavoráveis. Para a escolha das espécies, devem ser consideradas características de rusticidade, rápido crescimento, alta produção de biomassa e principalmente habilidade de estabelecer simbiose com rizóbios, uma vez que, quando a simbiose é eficiente, resulta no aporte de quantidades expressivas de nitrogênio para a nutrição da planta (FREITAS et al., 2012).

A jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir.) é uma espécie pioneira e abundante em áreas em estádios iniciais de regeneração da vegetação nativa (PEREIRA et al., 2003), ocorrendo em todos os tipos de solo. Características, como capacidade simbiótica de fixar nitrogênio atmosférico, fazem desta planta uma excelente candidata a programas de recuperação de áreas degradadas, por representar uma estratégia para a gestão da FBN nestes sistemas. Sem dúvida, as

fases iniciais de regeneração da vegetação após uso agrícola das áreas de caatinga são marcadas pela grande dominância de uma ou poucas espécies, sendo a jurema preta identificada com estas fases iniciais, formando, por vezes, comunidades quase monoespecíficas (SAMPAIO et al., 1998; PEREIRA et al., 2003; QUEIROZ; LEVIN, 2011). Porém, mesmo em caatingas maduras, a FBN associada à jurema preta pode representar um aporte de $18 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N ao ecossistema (SILVA et al., 2018).

No Brasil, os principais simbiontes associados a leguminosas do gênero *Mimosa* pertencem ao gênero *Paraburkholderia* (REIS JUNIOR et al., 2010; DIAS et al., 2021), mas é importante ressaltar que o esforço amostral no Bioma Caatinga ainda pode ser considerado baixo, diante das diferentes condições edafoclimáticas e de fisionomias vegetais existentes, o que pode encobrir informações importantes sobre os microssimbiontes de *Mimosa* na região. Já em um estudo conduzido no México, com algumas espécies endêmicas de *Mimosa* a nodulação preferencial era com alphaproteobactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Ensifer* (BONTEMPS et al., 2016). Na Índia, Gehlot et al. (2013) verificaram que as *Mimosa* nativas não eram noduladas por -betaproteobactérias, mas sim por um grupo de bactérias do gênero *Ensifer*.

A preferência de *Mimosa* pela associação com alguns grupos distintos de rizóbios em diferentes regiões podem estar relacionadas às condições ambientais, características do solo, como pH e fertilidade, e genótipos de ambos os parceiros (DALL'AGNOL et al., 2017; PIRES et al., 2018; PAULITSCH et al., 2019).

Vale salientar que, mesmo na presença de bactérias diazotróficas compatíveis e com a formação de nódulos nas plantas, a simbiose pode ser ineficiente. Souza et al. (2012), estudaram a FBN em fragmentos de caatinga sob diferentes tempos de regeneração e relataram baixa eficiência ou mesmo ausência de FBN. Tal estudo revela que informações sobre as respostas das leguminosas nativas da caatinga a variações ambientais, em termos de desempenho simbiótico, não foram totalmente esclarecidas na literatura.

Dessa forma, são necessários estudos para avaliar a ocorrência de bactérias eficientes/competitivas no solo e se há necessidade de inoculação em casos de programas de regeneração de áreas degradadas. A eficiência no processo de FBN pode ser limitada por diversas condições que vão desde a ausência de rizóbios competitivos e eficientes e especificidade simbióticas até a limitações ambientais (SANTOS et al., 2018)

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

A descrição inicial de uma coleção de micro-organismos utiliza a avaliação de características morfológicas e bioquímicas, tais como tempo de crescimento do isolado, coloração da colônia e alteração do pH do meio de cultura, entre outras avaliações que possibilita agrupar esses isolados de acordo com o fenótipo (SANTOS et al., 2017). Aliadas às características fenotípicas, as ferramentas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas no intuito de caracterizar esses micro-organismos geneticamente, bem como para avaliar sua diversidade e também no estudo de suas relações genéticas.

No presente estudo foi utilizada uma adaptação do protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) que possibilita a amplificação simultânea de dois genes envolvidos exclusivamente na simbiose entre rizóbio e leguminosa, o gene *nifH* e o gene *nodC*, denominada de DUPLEX-PCR (MOTHAPO et al., 2013; SILVA et al., 2019). Esse protocolo é utilizado na avaliação prévia da capacidade diazotrófica e nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. A vantagem de utilizar essa abordagem genética é a redução de tempo e trabalho gasto na autenticação das bactérias isoladas como ocorre na abordagem clássica, que é especialmente complicada quando se trabalha com leguminosas arbóreas. Além disso, apresenta vantagem sobre a detecção de um único amplicon, pois reduz o custo das reações e maximiza a utilização dos equipamentos possibilitando o teste de um maior número de isolados ao mesmo tempo.

A adaptação de um protocolo de PCR que possibilita a amplificação simultânea destes genes como o gene *nodC* (denominados fatores nod) e o gene *nifH* (que codifica a subunidade nitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase) são descritas na literatura e iniciadores já foram desenvolvidos para sua amplificação por PCR (LAGUERRE et al., 2001; POLY et al., 2001). O duplex foi utilizado por Silva (2020) em isolados de nódulos de feijão caupi cultivadas em solos do Semiárido, como ferramenta para selecionar bactérias para estudos de eficiência simbiótica.

A técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) consiste na amplificação prévia de fragmentos como do DNA ribossomal (*16S rRNA*), através de uma reação de PCR que posteriormente será submetido a clivagem por endonucleases ou enzimas de restrição. (DALL'AGNOL et al., 2016) Esta técnica tem poder discriminatório, permitindo o agrupamento filogenético dos indivíduos e vem

sendo utilizada para acessar a diversidade de rizóbios associados a diferentes ambientes e espécies (DALL'AGNOL et al., 2016).

O sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA já foi considerado marcador universal em estudos taxonômicos, por possuir características como ancestralidade comum, estabilidade genética, regiões conservadas que são informativas para estudos taxonômicos (STACKEBRANDT, 2006). Embora bastante utilizado, a filogenia baseada exclusivamente no 16S, apresenta inconsistências na determinação de espécies em se tratando de organismos muito próximos. A utilização de novos marcadores está sendo utilizada para cobrir as limitações da filogenia do gene 16S rRNA. Os genes constitutivos conhecidos como *housekeeping* como *recA*, *gyrB* e *rpoB* têm ganhado destaque em estudos de taxonomia de rizóbios e de suas relações filogenéticas (GLAESER; KÄMPFER, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e caracterização físico-química dos solos

A amostragem dos solos foi realizada de forma a representar diferentes condições edafoclimáticas que ocorrem no Semiárido de Pernambuco. Para isso, foram adotados dois critérios de seleção: cobertura vegetal e classe de solo.

Foram selecionadas 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 distintas. A escolha das áreas amostrais foi realizada 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.

O tipo de cobertura vegetal definido foi a caatinga densa, que consiste de vegetação nativa em estágio menos perturbado, considerando que a vegetação atual do Semiárido se apresenta como um mosaico de áreas com diferentes tempos de regeneração, intercaladas a áreas mais preservadas, e áreas com cultivos.



Figura 1 – Fragmentos de caatinga densa localizados no Semiárido pernambucano.

Para definir os pontos de coleta e diferenciar as áreas de caatinga de outras coberturas do solo foram utilizadas imagens de satélite envolvendo elementos de reconhecimento (tonalidade, cor e textura), com base em imagens da época chuvosa

e época seca, acompanhada por validação nas expedições de campo. Para o reconhecimento da cobertura vegetal, foram utilizados o sensor ccd1xs do satélite CBERS 2B (cena órbita 147 e ponto 110), 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), para a época chuvosa.

As classes de solo foram determinadas com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco - ZAPE, que engloba, 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). Nesse contexto, foram selecionadas 7 classes de solo (4 no primeiro nível categórico (Argissolo, Latossolo, Luvisolo, Planossolo) e 3 no segundo nível categórico (Neossolo litólico, Neossolo quartzarênico e Neossolo regolítico) Essas classes de solo representam cerca de 80% da área total do estado de Pernambuco (ARAÚJO FILHO et al., 2000). De posse destas informações, foi realizada uma sobreposição de imagens da cobertura vegetal com os mapas de tipos de solo a fim de selecionar as áreas amostrais distribuídas por todo o Semiárido de Pernambuco.

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, Luvisolo, Neossolo litólico e Planossolo. No Sertão do Pajeú e Moxotó foram selecionadas áreas de Argissolo, Luvisolo, 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.

Durante as expedições em campo foi verificado 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 realizada com apoio de pedólogos). O histórico de uso dos locais amostrados também foi consultado aos habitantes e trabalhadores das propriedades

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. A distribuição dos pontos

de coleta está na figura 2 e as informações gerais dos municípios encontram-se na Tabela 1.



Figura 2 – Distribuição dos pontos de coleta de solo no Semiárido Pernambucano.

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 o média anual (mm)	Temperatur a média anual
Agreste	Buíque	8° 36' 51" S / 37° 9' 39" W	846	691,4	21
	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
	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. Egito	7° 28' 49" S / 37° 16' 26" W	579	516,5	24
Tacaratu	9° 6' 9" S / 38° 8' 57" W	516	660,5	22,9	
Sertão de Brígida e Terra Nova	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
	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

Para a amostragem, em cada área foram estabelecidas três parcelas com dimensões de 20 x 20 m. Em cada parcela foram coletadas três amostras da camada superficial do solo (0-20 cm). As subamostras de cada parcela foram misturadas para a obtenção de uma amostra composta da parcela para representar os tratamentos. Após a coleta, as amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas à 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.

Amostras dos solos foram separadas para determinação dos atributos químicos (Tabela 2) e físicos (Tabela 3). 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 (Na^+), potássio (K^+) e fósforo (P) (extraídos com Mehlich-1 e dosados por fotometria de emissão de chama (Na^+ e K^+) e colorimetria (P)); cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), alumínio (Al^{3+}) (extraídos com KCl 1 mol L^{-1} e dosados por titulometria); acidez potencial (H+Al) (extraída com acetato de cálcio 0,5 mol 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.

ZC	Solo	Municípios	CE dS m ⁻¹	pH (H ₂ O)	C -----g kg ⁻¹ -----	N	P mg dm ⁻³	K ⁺ -----cmolc dm ⁻³ -----	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H+Al
Agreste	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	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
	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	

Sertão de Brígida e Terra Nova	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	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
	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. $X \pm Y$, 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.

ZC	FONTE		Densidade do solo	Densidade de partículas	Granulometria			Classificação textural
	Solo	Municípios			Areia	Silte	Argila	
			g cm ⁻³		%			
Agreste	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	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
	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	
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	Araripina	1,42 ± 0,01	2,54 ± 0,01	73,57 ± 5,18	17,13 ± 3,51	9,30 ± 1,9	Franco-arenosa
	S	Salgueiro	1,49 ± 0,04	2,52 ± 0,01	62,99 ± 0,37	30,33 ± 0,33	6,68 ± 0,66	Franco-arenosa
	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.

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

A ocorrência de populações de bactérias diazotróficas foi acessada por experimento em casa de vegetação utilizando como planta-isca a espécie *M. tenuiflora*, conhecida como jurema preta. Foram utilizados vasos de polietileno e cada amostra composta da parcela correspondeu a uma repetição do experimento. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com 33 tratamentos, que correspondem aos pontos amostrais, com três repetições (Figura 3).

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, com dez lavagens sucessivas em água destilada estéril (ADE) até a completa remoção do hipoclorito de sódio. 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, foram contados o número de folhas e medidos a altura e o diâmetro do colo das plantas, com régua e um paquímetro digital, respectivamente.



Figura 3 – Visão geral do experimento conduzido em casa de vegetação para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do Estado de Pernambuco, Brasil.

Os nódulos foram destacados e determinados o número de nódulos, acondicionados em recipientes contendo sílica gel para preservação, obtenção da biomassa seca de nódulos e posterior isolamento das bactérias.

As raízes foram separadas da parte aérea e lavadas, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h, sendo posteriormente pesadas para a obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST).

Além das variáveis citadas, determinou-se o teor de nitrogênio acumulado na parte aérea, que foi determinado pelo método de Kjeldahl (LIAO, 1981) no Laboratório de Energia da Biomassa do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE. O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação do teor de nitrogênio (em %) pela massa da parte aérea (em g) x 10 (fator de correção).

Os dados quantitativos relacionados ao experimento obtenção de nódulos com planta-isca foram analisados pela ANOVA e comparados pelo teste de médias de Scott-Knott ($p > 0,05$) usando o software Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011)

3.3 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos

Foram amostrados cinco nódulos aleatoriamente para cada unidade experimental. 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 contendo meio de cultura (YMA, pH 6.8) com adição do corante vermelho Congo (VINCENT, 1970). 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

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 ressuspenso 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 ressuspensionado 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 para posteriores análises.

3.4.2 Amplificação de fragmentos de genes *nifH* e *nodC* - DUPLEX

A triagem estabelecida como critério de autenticação do caráter de rizóbio dos isolados microbianos foi à amplificação simultânea dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* pelo método Duplex-PCR (SILVA et al., 2019). Os pares de primer utilizados foram: *nodC* NodCfor540 (TGATYGAYATGGARTAYTGGCT) / NodCrev1160 (CGYGACARCCARTCGCTRRTTG) (SARITA et al., 2005) e NodCforBurk (CTCAATGTACACARNGCRTA) / NodCrevBurk (GAYTGARTA) (Elliott et al., 2007). O par de primer universal *nifH* PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) / PolR (ATSGCCATCATYTCCRCCGGA) (POLY et al., 2001)

As reações foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo: tampão de reação 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 1,2 mM, Taq DNA polimerase 1,5 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 45 segundos) e extensão (72°C por 1 min), e extensão final a 72°C por 10 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 40 minutos, em tampão Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0,5X.

Os isolados que apresentaram amplicons em aproximadamente 630–650 bp para *nodC* (ambos pares de primers) e 360 bp para *nifH*, determinados utilizando o marcador molecular 100 pb DNA Ladder (DNA Express, Brasil) foram considerados positivos (rizóbios) e selecionados para as próximas etapas. 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)

Os isolados considerados positivos pelo método duplex, foram avaliados quanto a sua variabilidade genética pela técnica de 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, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,5 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U, iniciadores (0,20 µM) e 5 µL de DNA. A amplificação foi programada para um ciclo de desnaturação inicial (94°C por 4 min), 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (60°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 5 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 Duplex.

As reações de restrição foram conduzidas com as endonucleases *AluI*, *HhaI* e *HinfI* (Thermo Scientific, EUA). As digestões ocorreram “overnight” a 37°C em um volume final de 10 µL, contendo: 1 µL do tampão de reação 1X, endonucleases 5 U e 5 µL do produto da PCR. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose (1,0% p/v) a 100 V por 120 minutos, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. Ao final da eletroforese, os géis foram documentados em fotodocumentador LPix-STi (Loccus Biotecnologia, Brasil), as imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica), utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

A técnica de ARDRA também foi aplicada a quatro estirpes de referência, a saber: *Rhizobium etli* (CFN 42^T), *Paraburkholderia tuberum* (STM 678^T), *Paraburkholderia mimosarum* (BR 3454^T), *Paraburkholderia diazotrophica* (LMG 26031^T). A partir da análise do dendrograma de similaridade gerado pela análise dos perfis de ARDRA, foi adotado um “threshold” de 75 % de similaridade de

acordo com o coeficiente de Dice para selecionar representantes dos grupos para o sequenciamento do gene *16S rRNA* e *gyrB*.

3.4.4 Fingerprinting molecular por BOX-PCR

A variabilidade genética dos isolados selecionados para sequenciamento foi avaliada por meio dos perfis moleculares gerados por meio de reação de BOX-PCR. As reações foram conduzidas com o iniciador BOX-A1 (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) (VERSALOVIC et al., 1994). As reações foram dimensionadas para um volume final de 20 µL, utilizando: tampão de reação 1X, MgCl₂ 0,6 µL, dNTP 2,5 µL, Taq DNA polimerase 0,2 µL, 1,0 µL dos primers e 2,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 6 min, 35 ciclos de desnaturação (2 min a 94 °C), temperatura de anelamento de 52°C por 2 min e extensão (8 min a 72°C), um ciclo de extensão final a 72°C por 16 min.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (p/v) a 100 V por 120 minutos. Posteriormente o gel foi visualizado em transiluminador sob luz UV e fotografado em fotodocumentador, como citado acima. Todos os perfis foram avaliados com auxílio do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica)

3.4.5 Sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *gyrB*

Para a seleção dos isolados para sequenciamento, foram escolhidos representantes a partir do agrupamento gerado pelo ARDRA para o sequenciamento dos genes *16S rRNA* e *gyrB*. Para isso, a amplificação do gene *16S rRNA* foi realizada utilizando as mesmas condições e iniciadores descritos anteriormente no tópico de análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado.

Para a amplificação do gene *gyrB* utilizou-se os pares de iniciadores *gyrB*-BurkF (ACCGGTCTGCAYCACCTCGT) e *gyrB*-BurkR (YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC) (SPILKER et al., 2009) para amplificar o fragmento de aproximadamente 583 pb.

As reações foram dimensionadas para um volume final de 30 µL, contendo: tampão de reação 1X, MgCl₂ 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, para *gyrB*-Burk foram: 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 produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial de purificação GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), liofilizados e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul)

3.5 Análises estatísticas

Os padrões de agrupamento da ARDRA foram tabulados de acordo com a distribuição dos isolados em relação aos locais de origem. Para a análises de componentes principais (ACP) foram realizadas utilizando-se as características físico-químicas dos solos (análise 1) e dos grupos genotípicos do ARDRA (análise 2). Essas análises foram feitas no programa PaSt 4.02 (HAMMER et al., 2011). Para as ACP, foram excluídos os grupos raros, ou seja, com apenas 1 isolado.

Para a construção do dendograma de similaridade do ARDRA, foi utilizado o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA no programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). No BOX PCR os perfis genéticos também foram avaliados com auxílio do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica) utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendograma de similaridade.

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada com o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems, EUA) e a similaridade das sequências obtidas no sequenciamento foi comparada com aquelas depositadas no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) usando a ferramenta BLASTn.

As sequências das estirpes tipo (type strain) e dos isolados rizobianos com maior similaridade foram baixadas para o alinhamento e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbour-Joining e o modelo Jukes-Cantor com auxílio do programa MEGA 10 (TAMURA et al., 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 33 pontos amostrais, em 32 pontos foi confirmada a existência de microssimbiontes compatíveis através da nodulação natural das mudas de jurema preta. A nodulação foi mais abundante nas plantas cultivadas no Argissolo coletado no município de Itapetim, na zona climática do Sertão do Pajeú e Moxotó, porém os nódulos formados nas plantas cultivadas no Planossolo oriundo do município de Buíque apresentaram massa seca de nódulos estatisticamente semelhante aos nódulos proveniente de plantas cultivadas no Argissolo coletado em Itapetim (Tabela 4). Das duas classes de solo coletados em Custódia, classificados como Argissolo e Luvisolo, apenas as mudas cultivadas no Luvisolo apresentaram nodulação.

A preferência diferenciada de espécies do gênero *Mimosa* quanto aos seus pares simbióticos pode ser um dos fatores que influenciaram as diferenças de nodulação natural das mudas de jurema preta nos diferentes solos. Contudo, além da presença de microssimbiontes nativos nos solos, a nodulação pode ser atribuída a outros fatores edafoclimáticos, dentre os quais pode-se destacar a disponibilidade de nutrientes, principalmente o P e o N. A jurema preta não nodula em solos com baixa disponibilidade de P, principalmente nos que apresentam relação N/P mais altas (SILVA et al., 2017). Embora essa relação não possa explicar a maior nodulação das mudas cultivadas no solo de Itapetim, neste solo há uma das maiores disponibilidades relativas de P em relação ao N, mas em outras amostras essa característica também é encontrada. Desta forma, são necessários estudos mais refinados sobre ecologia das bactérias nodulíferas nativas desses solos, havendo uma necessidade de se relacionar a ocorrência de rizóbios também com a flora de cada ponto amostrado. Na Caatinga, os fragmentos de mata apresentam uma flora relativamente pobre, inferior a uma centena por hectare, mas o conjunto multiplica-se por causa das diferenças entre áreas, o que significa que, nas caatingas a diversidade beta é alta, enquanto a alfa é baixa (SAMPAIO; FREITAS, 2020).

As mudas apresentaram maior crescimento em altura quando cultivadas no Planossolo coletado em Buíque com valores de 77,3 cm e o menor valor de 21,0 cm quando cultivada no Argissolo coletado no município de Bodocó. O crescimento em diâmetro caulinar da jurema preta de maneira semelhante ao verificado para altura, também apresentou o menor crescimento quando

cultivadas no Argissolo coletado no município de Bodocó, provavelmente refletindo a disponibilidade de nutrientes nos solos.

A sobrevivência de espécies plantadas em áreas degradadas depende de diversos fatores, entre eles a altura e o diâmetro do colo adequado se destacam. Para espécies arbóreas, a medição da altura da planta é de grande importância, uma vez que é indicado que as mudas tenham altura média entre 15 e 30cm para serem transplantadas para campo (DUTRA et al., 2015). Segundo Delarmelina et al. (2014), a avaliação do diâmetro do colo também é uma variável de suma importância, pois, indica o potencial de sobrevivência da planta no campo após o transplântio definitivo.

Os menores valores de número de folhas, foram registrados para as mudas de jurema cultivadas no Planossolo oriundo de Terra Nova e no Argissolo coletado em Bodocó expressando valores de 16 e 14 folhas, respectivamente.

A produção da matéria seca da parte aérea, raiz, total e nódulos foram superiores nas mudas cultivadas no Planossolo coletado no município de Buíque, exceto para a massa seca de nódulos que além desse ponto de coleta, apresentou valor de 73,6mg para as plantas cultivadas no Argissolo coletado em Itapetim, não diferindo estatisticamente das plantas cultivadas no Planossolo coletado em Buíque.

Os maiores acúmulos de nitrogênio na parte aérea ocorreram no Planossolo coletado no município de Buíque, Neossolo Litólico coletado em Itaíba, Neossolo Regolítico coletado em Sanharó e no Argissolo coletado no município de Itapetim. Os menores acúmulos ocorreram no Argissolo coletado em Custódia e no Planossolo coletado em Terra Nova. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal forma de entrada de N em ecossistemas naturais, dessa forma, o baixo aporte de nitrogênio na parte aérea pode ser resultado da ineficiência do processo ou da baixa nodulação.

Tabela 4 – Diâmetro caulinar (DC), altura de plantas (ALT), número de folhas (NF), número de nódulos (NN), massa seca da parte aérea (MSPA) massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (NAPA) de plantas de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) cultivadas em vasos contendo solo.

Zona Climática	Municípios	Clas. de solo	DC	ALT	NF	NN	MSPA	MSR	MST	MSN	NAPA
			Mm	Cm	----- Unid.-----	----- g planta ⁻¹ -----	----- mg planta ⁻¹ -----				
Agreste	Buíque	Pla.	3,1aA	77,3aB	28aA	25cE	4,4aA	3,4aA	7,9aA	76,9aA	56,2aA
	Itaíba	NL	2,9bA	65,0bD	26aB	25cE	3,6bC	1,0fF	4,6dD	33,9dE	54,2aA
	Pedra	NL	2,2dE	63,3bD	23bB	24cE	2,7dD	0,2gK	2,9fG	25,0eG	18,2eG
	Sanharó	NR	2,9bA	68,7bC	26aB	43aC	3,2cC	1,3eE	4,4dD	45,5cD	53,4aA
	S.C. Capibaribe	Pla.	2,8bB	64,0bD	26aB	38bD	2,8dD	0,4gl	3,2eF	55,6bC	39,9bB
	S.B. Uma	Arg. ⁽¹⁾	1,7eG	45,7dF	18cD	6fH	1,0gH	0,4gl	1,4gJ	0,9gK	16,3eH
	S.B. Uma	Arg. ⁽²⁾	2,8bB	54,7cE	24aB	19dF	2,7dD	1,8cC	4,5dD	45,3cD	33,2cD
	S.B. Uma	Pla.	2,2dE	45,3eF	21bC	35bD	1,3gH	1,5dD	2,7fH	30,4dF	13,6fI
	Tupanatinga	NQ	3,1aA	70,3aC	25aB	10eG	3,5bC	1,6dD	5,1cC	12,5fI	42,1bB
	Venturosa	Pla.	2,5cC	71,0aC	23bB	12eG	2,2eE	0,9fG	3,0fG	16,6fH	25,3dE
V. Lério	NL	2,2dE	74,7aB	27aA	13eG	2,6dD	0,7gG	3,3eF	10,2fI	32,4cD	
CV^a(%)	-	-	4,74	7,54	7,65	19,29	5,92	13,78	7,12	14,80	7,38
Sertão do Pajeú e Moxotó	Betânia	Pla.	2,3cE	50,3cE	25bB	31bD	1,9cF	0,3fI	2,3eI	37,5dE	18,9eG
	Custódia	Luv. ⁽²⁾	2,4cD	61,3bD	24bB	28bE	2,5bE	0,4fI	2,8dG	53,8cC	32,6bD
	Custódia	Arg.	1,6fH	34,0dG	18cD	0dH	0,5dJ	0,2gK	0,7gL	0,0gK	8,5gJ
	Iguaracy	Pla.	2,4cD	59,0bD	26bB	16cF	1,9cF	0,9bF	2,8dG	17,6eH	22,9dF
	Inajá	NQ	2,5bC	52,0bE	21cC	22bE	1,9cF	1,2aE	3,2cF	9,9fI	27,2cE
	Ingazeira	Pla.	2,3cD	59,0bD	23bB	10cG	1,9cF	0,8cG	2,6eH	15,5eH	18,3eG
	Itapetim	Arg.	2,9aA	86,3aA	29aA	62aA	3,9aB	0,8cG	4,8aD	73,6aA	52,7aA
	S. Terezinha	NL	2,1dE	48,7cF	21cC	5dH	2,3bE	0,3fK	2,6eH	3,0gK	25,8cE
	S.J. Egito	Luv.	1,9eF	54,0bE	21cC	25bE	1,9cF	0,6eH	2,4eI	17,8eH	22,2dF
	S.J. Egito	NL	2,6bC	65,7bD	25bB	19cF	2,5bE	0,8cG	2,3cF	15,5eH	25,1cE
Tacaratu	NQ	1,9eF	47,7cF	23bB	12cG	0,9dI	0,7dG	1,6fJ	18,6eH	12,7fI	
CV^a(%)	-	-	3,82	9,74	7,55	28,85	11,37	11,03	10,42	15,66	11,15
Sertão de Araripina	Lat.		1,9dF	52,0cE	23bB	25bE	1,4dG	0,6cG	2,1dI	25,6bG	13,9cI

	Araripina	NL	2,8aB	75,7aB	32aA	34cD	3,4aC	1,1aF	4,5aD	35,0aE	22,3aF
	Bodocó	Arg.	1,4eI	21,0dH	14cE	27cE	0,8fI	0,7cG	1,5eJ	17,8cH	11,5dI
	Cabrobó	Pla.	2,6bC	51,3cE	23bB	53aB	1,9cF	0,7cG	2,6cH	24,1bG	19,7bG
	Ipubi	Arg.	1,8eG	45,0cF	17cD	7eH	0,8fI	0,2dK	1,0fK	11,3eI	13,3dI
	Petrolina	Arg.	2,0dF	29,0dG	17cD	15dF	1,1eH	0,6cH	1,7eJ	11,6eI	10,7dI
	Petrolina	Luv.	2,0dF	44,7cF	21bC	13dG	2,8bD	0,3dI	3,1bG	15,8dH	17,9bG
	Salgueiro	Pla.	1,8eG	50,0cE	22bC	20dE	1,1eH	0,4dI	1,5eJ	8,8eJ	14,6cH
	Santa Cruz	Lat.	2,2cE	61,0bD	22bB	16dF	1,7cF	0,6cG	2,4cI	14,3dH	18,8bG
	S.M.B. Vista	Luv.	1,9dF	47,0cF	20bD	25cE	1,2eH	0,3dK	1,5eJ	13,9dH	11,1dI
	Terra Nova	Pla.	1,7eG	42,3cF	16cE	17dF	0,8fI	0,2dK	1,1fK	6,0fJ	9,4dJ
CV^a(%)	-	-	6,67	11,88	12,19	19,96	10,90	18,63	9,30	16,82	11,49
CV^b(%)	-	-	5,05	9,58	9,05	22,69	9,07	15,31	8,78	15,89	9,72

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula entre as classes de solo e minúscula dentro de cada zona climática, pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade. ZN – zona climática; CV^a – Coeficiente de variação dentro de cada zona climática; CV^b – coeficiente de variação entre as classes de solo.

4.1 Obtenção dos isolados e caracterização fenotípica

Do experimento de planta-isca foram obtidos 391 isolados de bactérias de nódulos de jurema preta. Destes isolados, 95% apresentaram crescimento rápido (Figura 4A), 80% acidificam o meio de cultura (Figura 4B), 55% apresentaram cores amarela e 44% creme (Figura 4C) e 62% dos isolados produziram muito muco (Figura 4D).

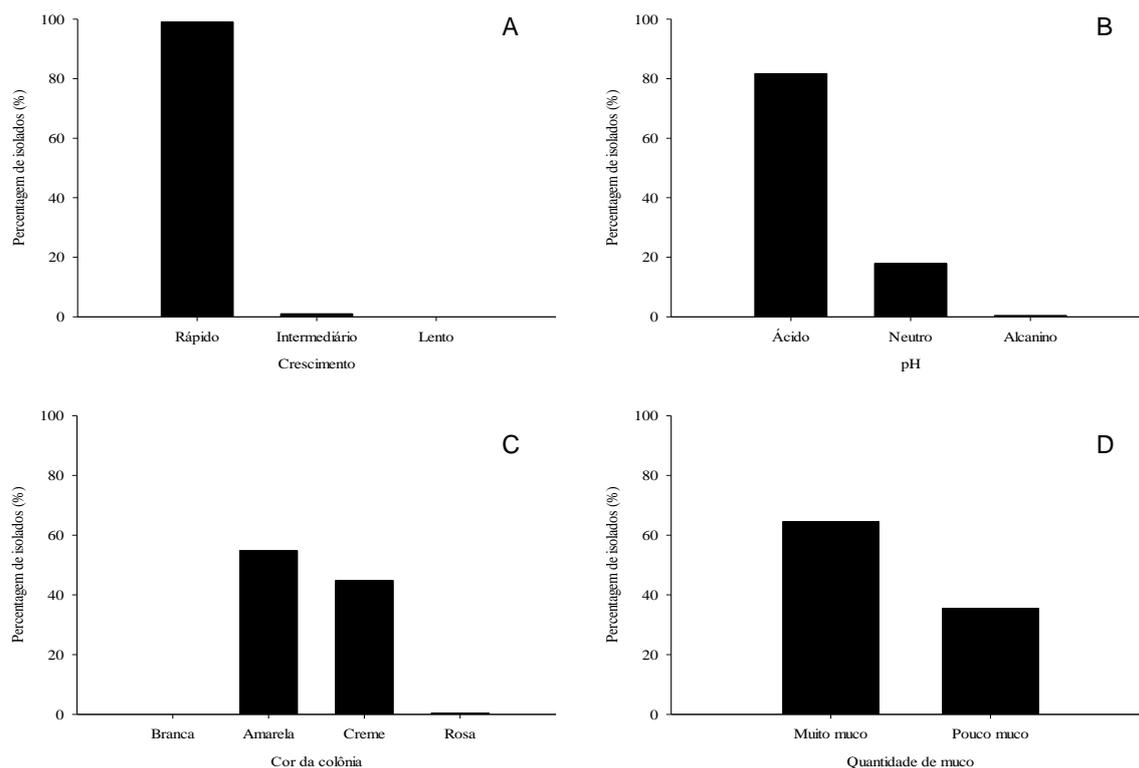


Figura 4 – Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.) nativos de classes de solos do semiárido pernambucano em função do crescimento (A), pH(B), cor da colônia (C) e quantidade de muco (D).

Na literatura já foi relatada a predominância de bactérias de crescimento rápido em isolados de leguminosas arbóreas do gênero *Mimosa* spp. cultivadas em regiões tropicais (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015). O crescimento bacteriano rápido é comum em regiões semiáridas e pode ser uma estratégia de sobrevivência para aumentar o crescimento durante o curto período de chuva (SANTOS et al., 2007).

Os isolados apresentaram, em sua maioria, coloração amarela ou creme, e alguns poucos apresentaram colônias de cor branca. Além dessas cores, os rizóbios podem ter colônias de cor rósea (HOWIESON; DILWORTH, 2016). A

cor creme é a mais relatada até o momento para colônias de bactérias de nódulos de jurema preta em meio YMA (FREITAS et al., 2014). Mesmo em leguminosas pertencentes a outras subfamílias essa cor tem predominado. Menezes et al. (2016) em estudo de caracterização e seleção de rizóbios de *Eritrina velutina* (Willd) nativos da Caatinga observaram uma predominância de colônias cremes e amarelas.

A alteração do pH do meio de cultura também foi observada e constatada na coleção, que em sua maioria apresentaram pH ácido, corroborando dados obtidos por Freitas et al. (2014). Saturno e Andrade (2015) observaram que 61% dos isolados de *Mimosa scrabella* obtidos de diferentes sistemas de uso da terra no estado do Paraná também apresentaram pH ácido.

A produção de exopolissacarídeos extracelular (EPE), caracterizada pela presença de muco na placa tem sido relatada na literatura como característica envolvida no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições edafoclimáticas adversas, como, por exemplo, as altas temperaturas encontradas na região semiárida. Todos os isolados apresentaram produção de muco, com predominância do tipo produtor de muito muco. Entre os isolados de Freitas et al. (2014), obtidos de nódulos de *M. tenuiflora* em solos sob caatinga no Semiárido paraibano, a maior proporção (30 a 40% nos três solos) apresentou colônias com produção moderada de muco, 26% apresentaram colônias secas e em apenas os isolados de um dos solos a proporção de isolados com alta produção de EPE (46%) foi maior que a proporção de isolados com produção moderada

No Brasil, tem-se demonstrado que a nodulação em *Mimosa* spp ocorre preferencialmente por espécies do gênero *Paraburkholderia* (antiga *Burkholderia*). Os rizóbios deste gênero apresentam características fenotípicas similares aos encontrados neste estudo, tais como crescimento rápido e reações ácidas em placa (FREITAS et al., 2014), o que pode explicar a maior frequência de isolados com estas características.

4.2 Amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* como ferramenta para confirmação do status de rizóbio

Todos os isolados obtidos foram submetidos à amplificação simultânea do gene *nodC* e *nifH*, que são os genes envolvidos no processo de nodulação e

fixação de nitrogênio (SILVA et al., 2019), sendo este o critério adotado no trabalho para autenticar os isolados como rizóbios. Esse critério também foi a primeira triagem realizada nos isolados, uma vez que o foco do trabalho foram os rizóbios. Dos 391 isolados, 250 (64%) foram positivos para a amplificação dos genes simbióticos *nifH* e/ou *nodC* (Figura 5).

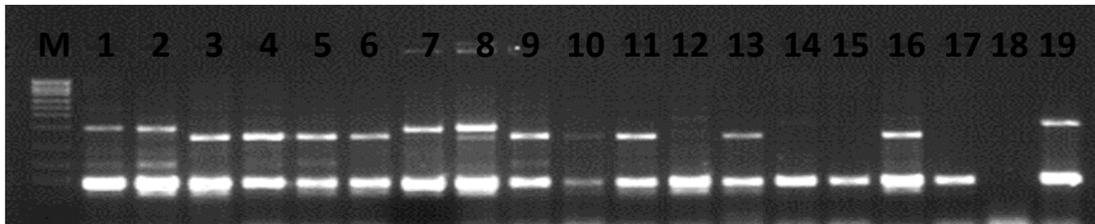


Figura 5 – Amplificação dos genes simbióticos *nodC* (650 pb) e *nifH* (360 pb) em rizóbios.

A autenticação do status de rizóbio de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas é um procedimento laborioso, que envolve a re-inoculação do isolado em seu hospedeiro original, em condições monoxênicas, para observação da nodulação (VINCENT, 1970). Este protocolo segue os postulados de Koch, que estabelecem comprovações para se poder estabelecer e aceitar uma relação causal entre uma dada bactéria (ou outro agente de doença transmissível) - e a doença em questão, afirmação esta que continua a ser admitida atualmente. No caso da relação entre rizóbio e leguminosa, o terceiro postulado (“o patógeno vindo de uma cultura pura deve ser inoculado em placas/cortes de lâminas sadias da mesma espécie ou variedade na qual apareceu, e deve provocar a mesma doença nas placas/cortes de lâminas inoculadas”) exige que a inoculação da bactéria cause a reprodução dos sintomas na planta, ou seja, a formação de nódulo. Entretanto, esse protocolo é laborioso e, em casos de leguminosas arbóreas que apresentam nodulação mais tardia, de controle mais difícil das condições monoxênicas. Como alternativa, diversos autores têm utilizado a técnica de duplex PCR, para detecção de genes de nodulação e de FBN como alternativa para autenticação de rizóbios de leguminosas arbóreas (SILVA et al., 2019). Rodrigues e colaboradores (2018), caracterizando rizóbios nativos de Mulungu (*Erythrina velutina*) quanto a presença dos genes *nifH* e *nodC*, comprovaram que cerca de 53% do total de isolados foram positivos para a amplificação de ambos os genes simbióticos pelo método de duplex PCR, corroborando com o presente estudo.

A não amplificação dos genes simbióticos pode ocorrer pela ausência desses genes, uma vez que pode ter sido isolada bactéria não rizobiana com características culturais similares aos rizóbios, a exemplo de bactérias dos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* que são endofíticas de nódulos, mas não nodulífera (JARAMILLO et al., 2013). Pode ocorrer também a perda de plasmídeos que carregam os genes relacionados à simbiose ao longo do processo de isolamento, purificação, estocagem das bactérias e realização das reações de PCR. Ainda pode ocorrer uma falha na amplificação, quando os primers utilizados na reação podem não anelar nos *loci* do gene *nodC* das bactérias (LAGUERRE et al., 2001; LIMA et al., 2012).

Quanto ao método de duplex PCR utilizado, ele foi eficaz em separar rizóbios de bactérias não rizóbias através da confirmação da presença de genes relacionados à nodulação e/ou que codificam a nitrogenase substituindo a abordagem clássica de autenticação de rizóbios em casa de vegetação, contribuindo na redução do trabalho e do tempo gasto com a autenticação dessas bactérias (SILVA et al., 2019).

4.3 Diversidade genética dos isolados de rizóbio utilizando ARDRA

Todos os 250 isolados obtidos na primeira triagem foram submetidos à Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), para avaliar a variabilidade genética da coleção (Figura 6).

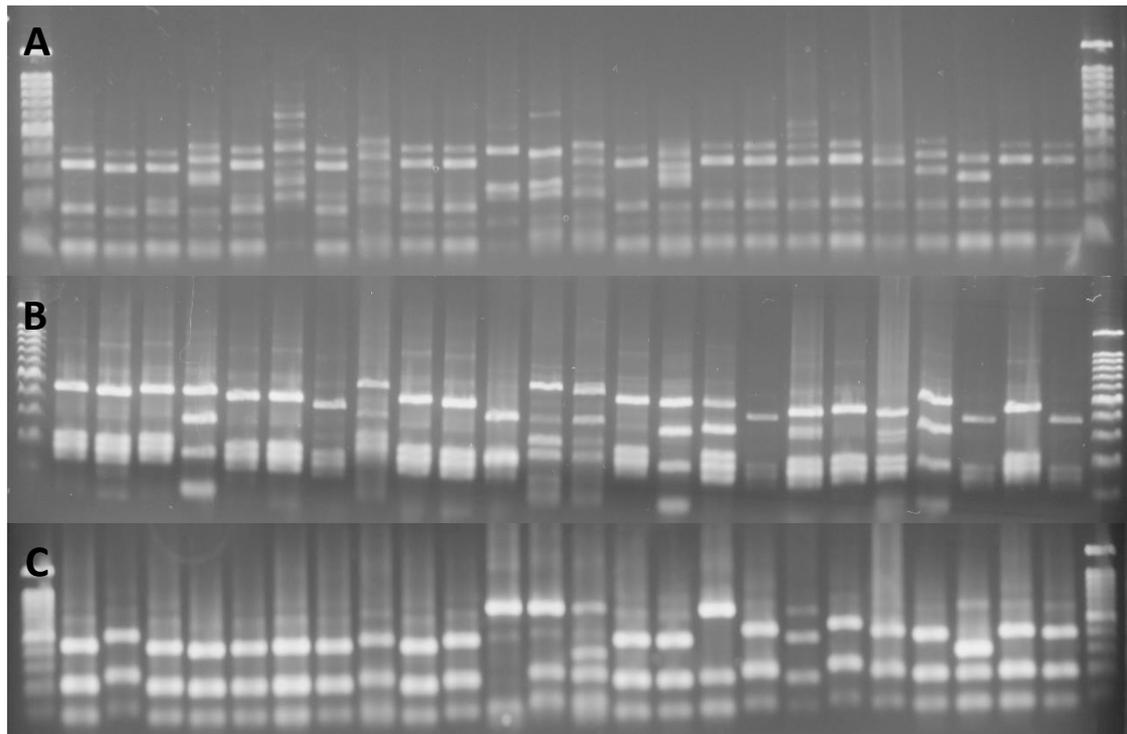
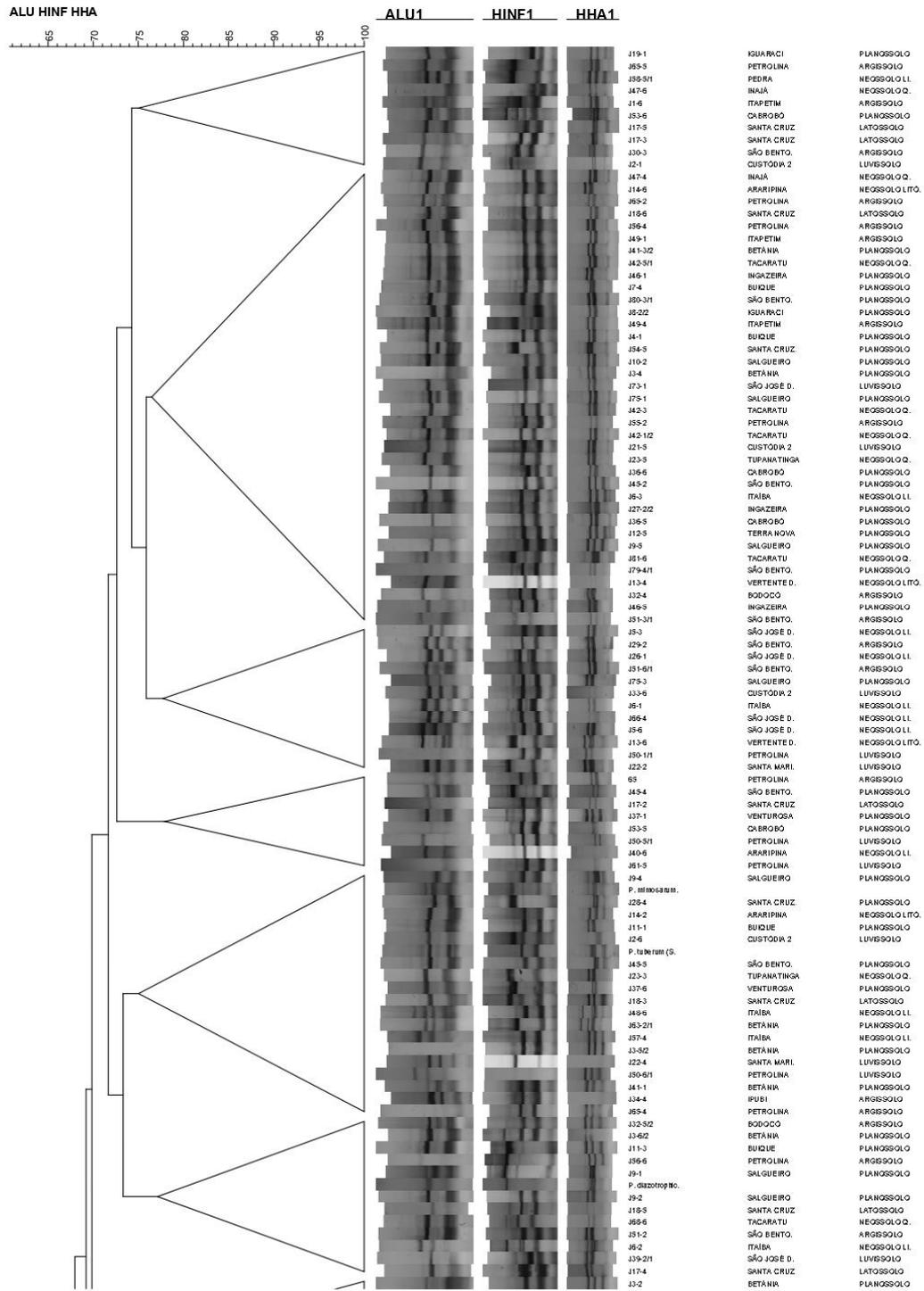


Figura 6 – Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de jurema preta cultivado em solos do Semiárido de Pernambuco. Enzimas: *AluI* (A), *HinfI* (B) e *HhaI* (C).

A análise conjunta dos perfis de restrição do 16S rRNA permitiu a formação de dois grandes grupos e 29 subgrupos com 75% de similaridade que, de acordo com a distribuição das estirpes referência, consistiu na separação dos isolados nas classes das Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria (Figura 7).



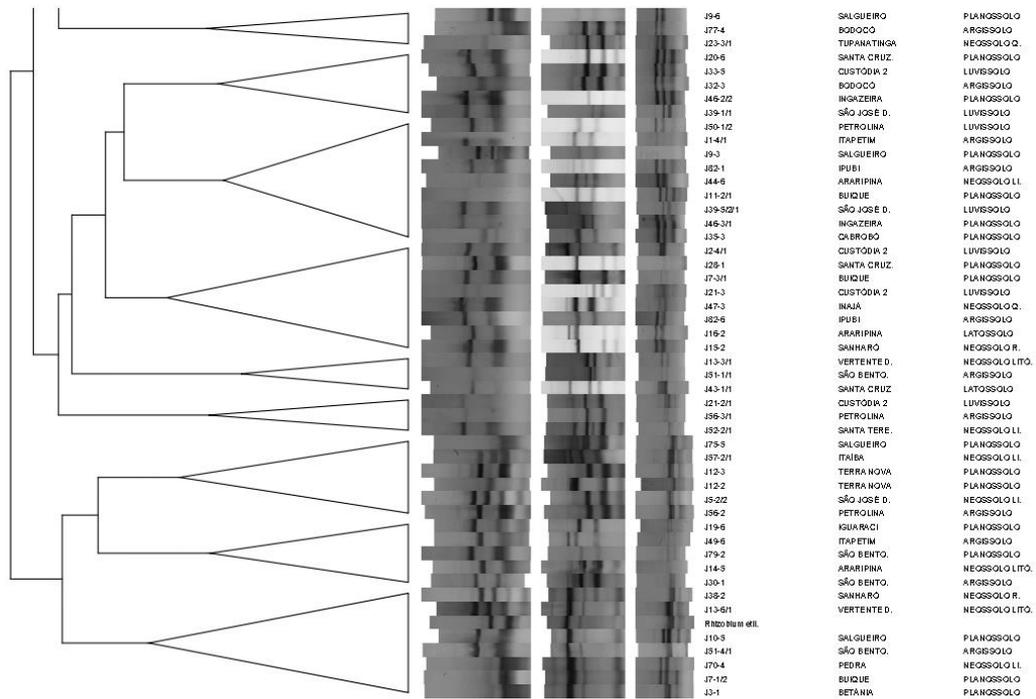


Figura 7 – Dendrograma de similaridade com base nos perfis polimórficos da técnica ARDRA usando 16S rRNA como o produto de PCR e endonucleases *AluI*, *Hinf* e *HhaI*. As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica), utilizando o método de agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice.

A ACP mostrou que os componentes principais 1 e 2, juntos explicaram 20,58% da variância dos dados (Figura 8). Foi constatado perfis diversos em todas as classes de solo estudadas, demonstrando que microssimbiontes de jurema preta são amplamente distribuídos por todo o Semiárido de Pernambuco. A análise de componentes principais constatou que não há uma relação biogeográfica entre os grupos formados e a origem dos isolados.

A partir desse resultado foram selecionados representantes dos grupos de ARDRA para análise de fingerprinting molecular, a fim de descartar possíveis clones e posteriormente prosseguir com o sequenciamento.

4.4 BOX PCR

A análise de fingerprinting molecular dos 48 isolados permitiu identificar a diversidade intraespecífica dos perfis genéticos obtidos e indicou um grau elevado de diversidade genética, uma vez que todos os isolados apresentaram perfis únicos de DNA, reforçando a necessidade de mais estudos complementares a nível taxonômico (Figura 9).

Liu et al. (2020) estudando a diversidade e distribuição geográfica de microssimbiontes associados a duas espécies de *Mimosa* também identificaram alto polimorfismo entre os perfis dos isolados estudados e atribuíram esse resultado aos locais de amostragem, que cobriu diversos tipos de solo e forçou a diversificação dos rizóbios.

Os resultados de Dall'Agnol et al. (2016) e Paulitsch et al. (2020) corroboram o presente trabalho, com alto polimorfismo entre os isolados indicando alta diversidade genética na coleção.

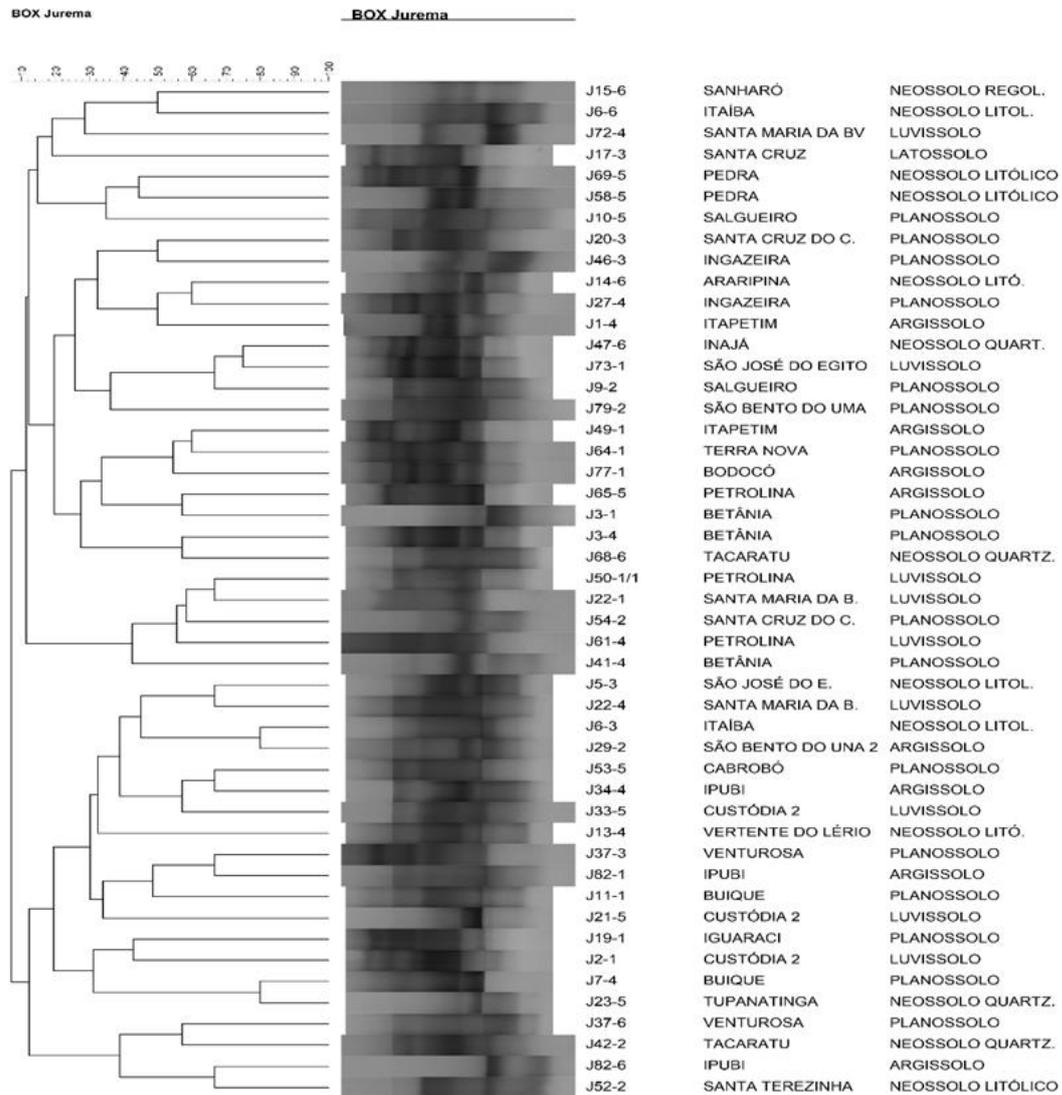


Figura 9 – Agrupamento de perfis de BOX PCR dos isolados selecionados para sequenciamento.

4.5. Sequenciamento do gene 16SrRNA

Para o posicionamento taxonômico, 48 isolados selecionados no agrupamento do ARDRA foram submetidos à amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, purificação e sequenciamento. Destes, 36 apresentaram sequências de boa qualidade em ambos os sentidos de sequenciamento (*forward* e *reverse*) após verificação no programa SeqScanner (Figura 10) e posteriormente tiveram suas sequências montadas e alinhadas com sequências de estirpes depositadas no banco de dados GenBank. Aqueles que não apresentaram sequências satisfatórias, não puderam ser identificados.



Figura 10 – Análise da qualidade da sequência parcial do gene 16S da estirpe de *Paraburkholderia* sp. C35-3 por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 1097 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20).

O gene 16S rRNA caracteriza-se como o principal componente da subunidade ribossômica nos procariontes. Esse gene encontra-se presente em todas as bactérias e apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicador de como os microrganismos estão intimamente relacionados durante a evolução em milhões de anos (ATLAS; BARTHA, 1998)

A maioria dos isolados apresentaram similaridade com *Paraburkholderia phenoliruptrix*, um total de 14 isolados com similaridade próxima a 99% (Figura 11). Os isolados agrupados com essa espécie estão distribuídos em todas as classes de solo e zonas climáticas (Agreste e Sertão) estudadas, abrangendo 13 municípios do Semiárido de Pernambuco. Das espécies arbóreas da caatinga, as pertencentes ao gênero *Mimosa* têm recebido atenção em estudos sobre o potencial simbiótico e seus microsimbiontes (DIAS et al., 2021; FREITAS et al., 2014). A espécie *Paraburkholderia phenoliruptrix* possui uma relação altamente específica e eficiente em nodular *Mimosa flocculosa*, mas também é capaz de nodular efetivamente outras espécies de leguminosas (CUNHA et al., 2012). Dias et al. (2021), incluíram isolados semelhantes a *P. phenoliruptrix* da lista de beta-rizóbios eficientes em *Mimosa* na Caatinga.

Os isolados 82.6, 82.1 obtidos do mesmo solo e 42.2 se aproximaram com a *Paraburkholderia diazotrófica*, mas nenhuma com 100% de similaridade com a estirpe tipo (Figura 9). *Paraburkholderia diazotrophica* foi descrita por Sheu et al. (2013). Os autores identificaram cinco estirpes com a nova espécie de *P. diazotrophica*. Dessas cinco, três são oriundas de nódulos de leguminosas do gênero *Mimosa*. *Mimosa candolei* coletados na Chapada dos Veadeiros, *Mimosa pudica* da Chapada Diamantina e de *Mimosa tenuiflora* coletadas no estado da Bahia. A presença de *Mimosa tenuiflora* por todo bioma Caatinga, pode contribuir com a dispersão de *P. diazotrophica* nos solos da região e justificar a similaridade dos três isolados do presente estudo agrupados com *P. diazotrophica*.

O isolado 34.4 de origem de um Argissolo no sertão de Ipubi, apresentou similaridade próxima a *Paraburkholderia atlantica* descrita por Paulitsch et al. (2020). Essa espécie foi isolada de nódulos radiculares de *Mimosa pudica* e *Phaseolus vulgaris* inoculados com solos da Mata Atlântica brasileira. Com os resultados desta pesquisa foi possível descrever duas novas microsimbiontes de mimosa *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. e *Paraburkholderia franconis* sp. Nov.

O gênero *Paraburkholderia*, pertencente à classe das beta-proteobactérias, é frequentemente associado à leguminosas do gênero *Mimosa* (ELLIOTT et al., 2009; BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015) e já foi identificado em outras leguminosas arbóreas como mulungu (*Erythrina velutina*) em solos de Caatinga (RODRIGUES et al., 2018).

Embora beta-rizóbios sejam os microsimbiontes preferidos por espécies de *Mimosa*, os alfa-rizóbios também são capazes de nodular mimosas. Vale destacar que mimosas disseminadas possuem um maior espectro de microsimbiontes em relação as espécies endêmicas. A simbiose nestas plantas pode ser compatível, porém ineficiente (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013).

Diversos autores já relataram preferência diversificada das espécies de *Mimosa* em relação aos microsimbiontes (GEHLOT et al., 2013; BONTEMPS et al., 2016; PLATERO et al., 2016). Para esses autores, a preferência das mimosas por grupos de rizóbios distintos pode estar relacionada às características do solo, como pH, filogenia do hospedeiro, coevolução das espécies que pode influenciar a seleção de simbiontes (ELLIOTT et al., 2009; PIRES et al., 2018).

Bontemps et al. (2016), observaram que no México, considerado um importante centro de diversidade de *Mimosa*, espécies endêmicas de *Mimosa*, associaram-se preferencialmente com alfa-proteobactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Ensifer*. No Uruguai, espécies de mimosa estão predominantemente associados ao gênero *Cupriavidus*, da classe das betaproteobactérias (PLATERO et al., 2016). Na Índia, o gênero *Ensifer* é o simbiote predominante em duas espécies endêmicas de *Mimosa* (GEHLOT et al., 2013).

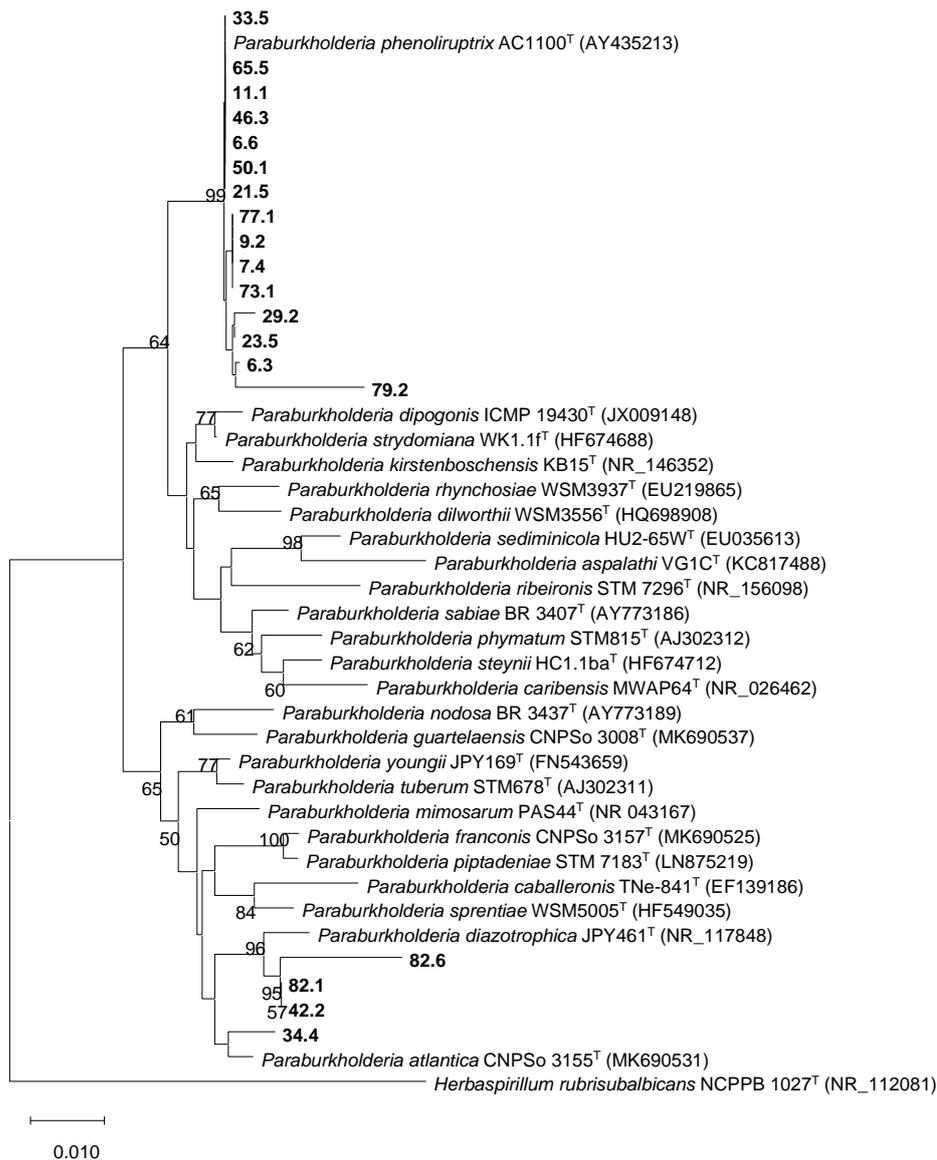


Figura 11 – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base e sequências parciais do gene 16S de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo estão em negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

4.6 Sequenciamento dos genes constitutivos *gyrB*

A análise filogenética do gene *gyrB* agrupou os isolados de forma semelhante ao *16SrRNA* com exceção dos isolados 42.2, 82.1 e 82.6 que agruparam com *Paraburkholderia franconis*, enquanto no *16srRNA* os mesmos isolados apresentaram afiliação filogenética com gênero *Paraburkholderia diazotrofica* (Figura 12).

Os genes conservadores do metabolismo microbiano, conhecidos como genes *housekeeping* constituem um conjunto de genes localizados no cromossomo bacteriano e estão envolvidos em diversos mecanismos para manutenção da célula bacteriana. O *gyrB* é um gene constitutivo responsável por codificar para a subunidade β da DNA girase, uma enzima responsável por introduzir superenovelamentos negativos no DNA bacteriano, atividade fundamental na replicação dos cromossomos (WATT; HICKSON, 1994).

Em avaliações filogenéticas, muitas vezes o 16S apresenta baixa resolução taxonômica, principalmente se tratando de organismos muito próximos e tem se utilizado como estratégia o sequenciamento de genes *housekeeping*. O gene *gyrB* é um destes genes *housekeeping* que possuem maior poder discriminatório comparado ao 16S rRNA, podendo definir a identidade taxonômica a nível de espécie (MAIDEN et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Alguns autores adotam análise de sequência multilocus (MLSA) para definir com maior clareza informações relacionadas à evolução e filogenia de microorganismos. Essa análise permite a avaliação conjunta de mais de um gene constitutivo em uma única sequência concatenada, possibilitando a descrição em nível de espécie. Recentemente Paulitsch et al. (2020), utilizaram a análise de sequência multilocus com quatro genes constitutivos: *recA*, *gyrB*, *trpB* e *gltB*, para descrever as espécies do *Paraburkholderia franconis* e *Paraburkholderia atlantica* oriundas de solos da mata atlântica brasileira.

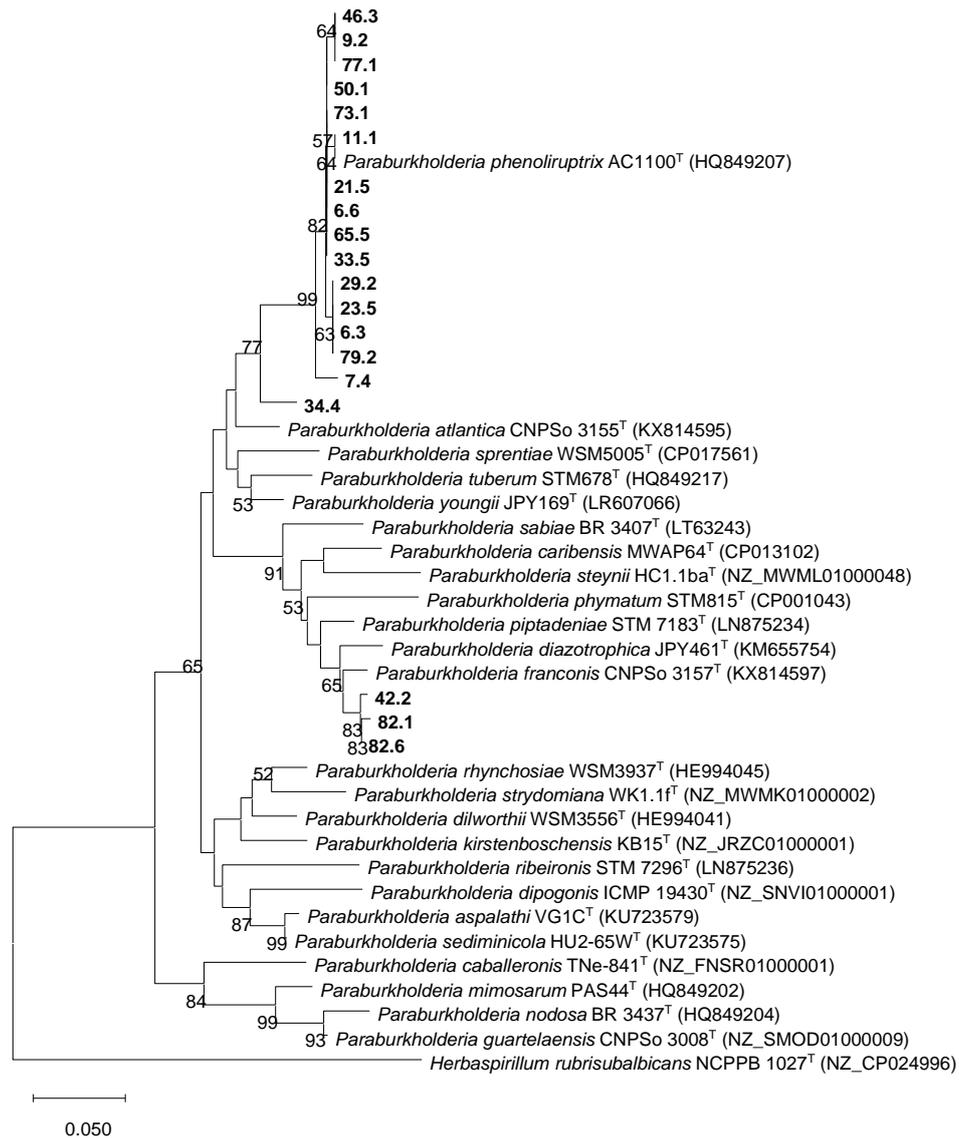


Figura 12 – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base e sequências parciais do gene *gyrB* de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo estão em

negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

A concatenação das sequências dos genes *16srRNA* e *gyrB* foi realizada e a árvore filogenética com base nessas sequências foi gerada e pode ser encontrada na Figura 13. Nesta árvore é possível observar que muitos dos isolados mantiveram as suas afiliações filogenéticas observadas nas árvores dos genes individuais. Os isolados do presente estudo apresentaram similaridade muito próxima de 100% à espécie *Paraburkholderia phenoliruptrix*, reforçando o que foi verificado na construção das outras árvores isoladas.

Como já mencionado anteriormente, a utilização de sequências concatenadas dos genes housekeeping, permite uma melhor definição da taxonomia das estirpes em estudo, definição de possíveis novas espécies de rizóbios, além de serem especificamente eficientes para filogenia e taxonomia do gênero *Paraburkholderia* (DALL'AGNOL et al., 2016; LV et al., 2016).

A filogenia dos genes 16S combinada com a análise de genes housekeeping conferem uma elevada resolução taxonômica, servindo como base para reclassificação e proposta de novas espécies de *Paraburkholderia*. Apesar dos genes constitutivos e os ribossomais apresentarem tamanhos distintos e graus de conservação muito divergentes, alguns autores como Pires et al. (2018), utilizaram a concatenação de sequências dos genes constitutivos com os ribossomais de forma satisfatória.

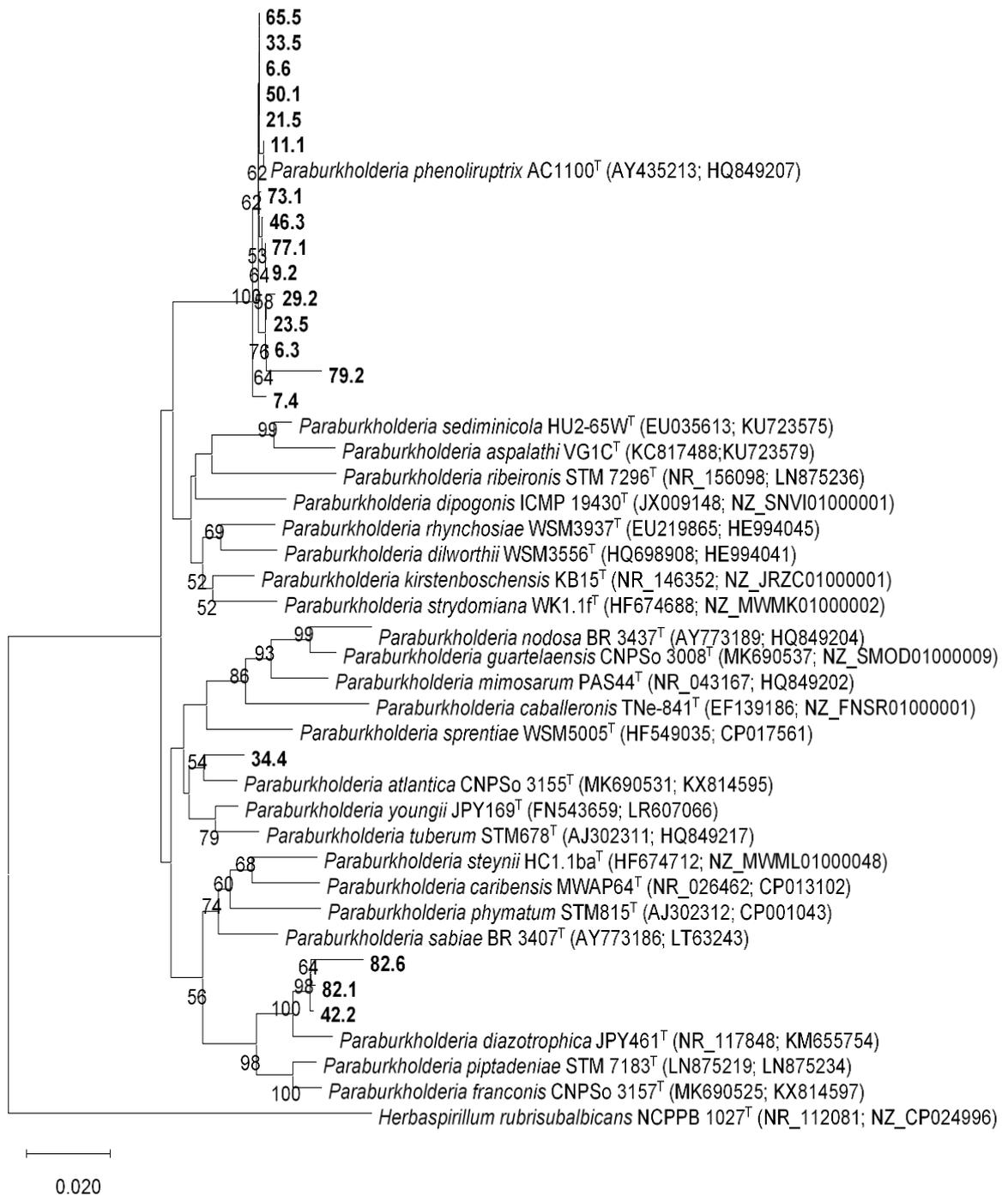


Figura 13 – Árvore filogenética (método Neighbor-Joining, modelo Jukes-Cantor) construída com base em sequências concatenadas dos genes *gyrB* + *16S* de 19 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* e de 24 estirpes tipo utilizadas como referências. Números nas ramificações representam os valores de bootstrap > 50% com 1000 repetições. Os isolados do estudo

estão em negrito e o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* NCPPB 1027^T foi incluído como grupo externo, respectivamente. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos.

Dentre as bactérias submetidas ao sequenciamento identificadas algumas filiações foram divergentes quando comparadas pelo 16SrRNA e *gyrB* (Tabela 4).

Os isolados 52.2, 13.4, 19.1, 22.4 e 17.3 apresentaram entre 97 e 99 % de similaridade com *Bacillus* no 16S enquanto que no *gyrB* as sequências eram similares a *Paraburkholderia*. Essas divergências entre as afiliações ocorreram também com outros isolados, como 47.6, 69.5, 58.5, 68.6, 22.1 que foram semelhantes com *Enterobacter* no 16S e com *Paraburkholderia* no *gyrB*. O isolado 20.3 e 49.1 foi identificado como *Pantoea* no 16s e *Paraburkholderia* no *gyrB*. Os isolados 3.1 e 3.4 foi identificado com *Agrobacterium* pelo 16S e como *Paraburkholderia* pelo *gyrB*. E os isolados 37.3 e 37.6 relacionado com gênero *Rhizobium* pelo 16S e *Paraburkholderia* pelo *gyrB*.

Essas divergências ocorreram provavelmente por contaminação da amostra com mais de um tipo de DNA. Para amplificação e sequenciamento do gene 16SrRNA foi utilizado um primer universal com sequências de nucleotídeos que são comuns em um determinado conjunto de moléculas, desta forma, eles são capazes de se ligar a uma ampla variedade de modelos de DNA. Já para o gene *gyrB*, foi utilizado um primer específico para sequência particular de nucleotídeos de DNA para *Paraburkholderia*, desse modo a reação de PCR amplificara apenas DNA desse gênero *gyrB* (YOUNG et al., 1991; SPILKER et al., 2009).

Os isolados 37.3 e 37.6 apresentaram similaridade ao gênero *Rhizobium*, corroborando resultados encontrados com Dias et al. (2021), que também identificaram alfa-rizóbios do gênero *Rhizobium* isolados de nódulos de *Mimosa tenuiflora*. Embora *Rhizobium* não seja o microssimbionte predominante em mimosas no Brasil, ele também já foi identificado nodulando raiz de *Mimosa caesalpinifolia* Benth no Semiárido (OLIVEIRA et al., 2019).

Tabela 5 – Identificação dos isolados de *Mimosa tenuiflora* por meio da comparação de sequências do gene 16S e *gyrB* com as estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank.

Sequências similares encontradas no GenBank							
ID	LOCAL	SOLO	16s	Número de acesso 16s	GYRB	Número de acesso GyrB	Similaridade % GYRB-16S
21.5	CUSTÓDIA/ Sertão	LUVISSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-100
73.1	SÃO JOSÉ DO EGITO/ Sertão	LUVISSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-100
29.2	SÃO BENTO DO UNA 2/ Agreste	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99-100
52.2	SANTA TEREZINHA/ Sertão	NEOSSOLO LITÓLICO	<i>Bacillus aryabhattai</i>	MK508857.1	<i>Paraburkholderia diazotrophica</i>	KM655754.1	97-100
13.4	VERTENTE DO LÉRIO/ Agreste	NEOSSOLO LITÓLICO.	<i>Bacillus aryabhattai</i>	MK182805.1	<i>Paraburkholderia zhejiangensis</i>	HF5472690.1	98-98
82.1	IPUBI/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia diazotrophica</i>	NR_117848.1	<i>Paraburkholderia piptadeniae</i>	LN875234.1	97-100
23.5	TUPANATINGA/ Agreste	NEOSSOLO QUARTZARÊNICO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-100
6.3	ITAÍBA/Agreste	NEOSSOLO LITOL.	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-100
7.4	BUIQUE/ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99-100
77.1	BODOCÓ/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-100
20.3	SANTA CRUZ DO C./ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Pantoea anthophila</i>	MZ501278.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100-96
50.1	PETROLINA/	LUVISSOLO	<i>Paraburkholderia</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia</i>	HQ849207.1	100-100

	Sertão		<i>phenoliruptrix</i>		<i>phenoliruptrix</i>		
19.1	IGUARACI/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Bacillus aryabhatta</i>	MK182805.1	<i>Paraburkholderia graminis</i>	HQ849199.1	100/99
79.2	SÃO BENTO DO UNA/ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_118072.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	97/99
6.6	ITAÍBA/ Agreste	NEOSSOLO LITOLICO.	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99/99
22.4	SANTA M ^a DA BV./ Sertão	LUVISSOLO	<i>Bacillus flexus</i>	MZ276303.1	<i>Paraburkholderia susongensis</i>	KM246786.1	99/95
42.2	TACARATU/ Sertão	NEOSSOLO QUARTZ.	<i>Paraburkholderia diazotrophica</i>	NR_117848.1	<i>Paraburkholderia piptadeniae</i>	LN875234.1	100/97
46.3	INGAZEIRA/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99/100
14.6	ARARIPINA/ Sertão	NEOSSOLO LITÓ.	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia xenovorans</i>	CP008760.1	100/94
34.4	IPUBI/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia atlantica</i>	MK690531.1	<i>Paraburkholderia youngii</i>	LR607066.1	99/94
47.6	INAJÁ/ Sertão	NEOSSOLO QUART.	<i>Enterobacter -</i>	AP019007.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	86/99
82.6	IPUBI/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia diazotrophica</i>	FN543755.1	<i>Paraburkholderia piptadeniae</i>	LN875234.1	96/97
9.2	SALGUEIRO/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100/100
3.1	BETÂNIA/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Agrobacterium</i>	NR_074266.1	<i>Paraburkholderia piptadeniae</i>	LN875234.1	99/97
69.5	PEDRA/ Agreste	NEOSSOLO LITÓLICO	<i>Enterobacter</i>	CP011863.1	<i>Burkholderia zhejiangensis</i>	HF5472690.1	99/95
58.5	PEDRA/Agreste	NEOSSOLO LITÓLICO	<i>Enterobacter</i>	CP011863.1	<i>Paraburkholderia grimmiae</i>	HG324054.1	99/96
11.1	BUIQUE/ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100/100
65.5	PETROLINA/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100/100
68.6	TACARATU/ Sertão	NEOSSOLO QUARZARÊNICO	<i>Enterobacter bugandensis</i>	KY285194.1	<i>Paraburkholderia zhejiangensis</i>	HF5472690.1	99/99

49.1	ITAPETIM/ Sertão	ARGISSOLO	<i>Pantoea spetica</i>	MT777177.1	<i>Paraburkholderia susongensis</i>	KM246786.1	98/95
3.4	BETÂNIA/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Agrobacterium</i>	NR_074266.1	<i>Paraburkholderia glumae</i>	CP009435.1	99/95
37.3	VENTUROSА/ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Rhizobium viscosum</i>	NR_042253.1	<i>Paraburkholderia grimmiae</i>	HG324054.1	99/97
17.3	SANTA CRUZ/ Sertão	LATOSSOLO	<i>Bacillus sp</i>	MT554518.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99/99
33.5	CABROBÓ/ Sertão	PLANOSSOLO	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	NR_042901.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	100/100
22.1	SANTA M ^a DA BV./ Sertão	LUVISSOLO	<i>Enterobacter</i>	CP011863.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99/100
37.6	VENTUROSА/ Agreste	PLANOSSOLO	<i>Rhizobium jaguaris</i>	CP032694.1	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	HQ849207.1	99/93

5 CONCLUSÕES

Os solos do Semiárido brasileiro abrigam populações de rizóbios capazes de formar simbiose com a jurema preta, apesar da grande diversidade de condições edafoclimáticas e de diversidade beta apresentada pelos fragmentos de caatinga encontrados no Bioma Caatinga. Os dados deste trabalho confirmam que bactérias do gênero *Paraburkholderia* são os simbiontes preferidos de *Mimosa tenuiflora*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO FILHO, J. A. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. Recife: Projeto Dom Helder Câmara, p.195, 2013.

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. p.378.

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.

ALVES, J. J. A. Geoecologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro. **Revista Climatologia e Estudos da Paisagem**, Rio Claro, v. 2, n. 1, p. 58-71, 2007.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Ecologia microbiana: Fundamentos e Aplicações. Benjamin/Cummings. **Science Publishing**, p. 281-324, 1998.

BONTEMPS, C.; ROGEL, M.A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M.F.; MOULIN, L.; ELLIOTT, G.N.; LACERCAT-DIDIER, L.; DASILVA, C.; GREYER, R.; CAMARGO-RICALDE, S.L.; CHEN, W.; SPRENT, J.I.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Endemic Mimosa species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist** v.209, p.319–333, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.13573>.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; SIMON, M.F.; DOS REIS JÚNIOR, F.B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N.E.; DE LOUREIRO, M.F.; DE FARIA, S.M.; Sprent, J.I.; James, E.K.; Young, J.P. W. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**. V.19, p.44–52, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>.

BOURNAUD, C.; DE FARIA, S.M.; DOS SANTOS, J.M.F.; TISSEYRE, P.; SILVA M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS E.; JAMES E.K.; PRIN Y.; MOULIN L.; Burkholderia Species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (tribe mimoseae). **Plos One**, v.8, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063478>

CUNHA, C.O.; ZULETA L.F.G.; DE ALMEIDA L.G.P.; CIAPINA L.P.; BORGES W.L.; PITARD R.M.; BALDANI J.I.; STRALIOTTO R.; DE FARIA S.M.; HUNGRIA M.; CAVADA B.S.; MERCANTE F.M.; DE VASCONCELOS A.T.R.; Complete genome sequence of Burkholderia phenoliruptrix BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of mimosa flocculosa. **Journal of Bacteriology**, v.194, p.6675–6676, 2012. <https://doi.org/10.1128/JB.01821-12>.

DALL'AGNOL, R.F.; PLOTTEGHER F.; SOUZA R.C.; MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. DOS; BENA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M.; *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, p.108, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsec/fw108>

DALL'AGNOL, R.F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S.M.; BÉNA, G.; MOULIN, L., HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v.93, n. 4, p. 2017. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>

DELARMINA, W. M.; CALDEIRA, M. V. W.; FARIA, J. C. T.; GONÇALVES, E. D. O.; & ROCHA, R. L. F. Diferentes substratos para a produção de mudas de *Sesbania virgata*. **Floresta e Ambiente**, v.21, p.224-233, 2014. <http://dx.doi.org/10.4322/floram.2014.027>

DIAS, M. A. M.; BOMFIM, C. S. G; RODRIGUES, D R.; SILVA, A. F ; SANTOS, J. C. S; NASCIMENTO, T. R.; ; MARTINS, L. M. V; BÁRBARA FRANÇA DANTAS; RIBEIRO, P. R. DE A; FREITAS, A. D. S ; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. *Paraburkholderia* spp. are the main rhizobial microsymbionts of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. in soils of the Brazilian tropical dry forests (Caatinga biome). **Systematic and Applied Microbiology**, v.44, p.12620, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126208>.

DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; MATOS, P. S.; SARMENTO, M. F. Q.; OLIVEIRA, J. C. D. Crescimento inicial e qualidade de mudas de caviúna-do-cerrado e carobadocampo em resposta a adubação nitrogenada. **Agropecuária Científica do Semiárido**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 52-61, 2015. <https://doi.org/10.30969/acsa.v11i3.647>

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**. v.100, p.1403–141, 2007. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm227>.

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

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

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007 <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000300017>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. <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, 2012. <http://DOI: 10.1007 / s10705-012-9545-6>

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. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6518>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife, v.8, p. 585-597, 2015. <https://doi.org/10.26848/rbvf.v8.0.p585-597>

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, 1039–1042, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

GEHLOT, H. S.; TAK, N.; KAUSHIK, M.; MITRA, S.; CHEN, W. –M.; POWELEIT, N.; PANWAR, D.; POONAR, N.; PARIHAR R.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; OJHA, A.; RAO, S. R.; SIMON, M. F., DOS REIS JUNIOR., F. B.; PERIGOLO, N.; TRIPATHI, A. K.; SPRENT, J. I.; PETER, W. Y.; JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P. An invasive *Mimosa* in India does not adopt the symbionts of its native relatives. **Annals of Botany**, v. 112, n. 1, p. 179–196, 2013. <http://doi: 10.1093/aob/mct112>

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, p. 101-111. 2016.

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. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>.

HAMMER, O.; DAVID, A.T.; HARPER.; PAUL D.R. PaSt: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaentologia Electronica**, v. 4, n. 4, p. 5–7, 2011.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, p. 314, 2016.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p.397-404, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. **Microbiology**. v.147, p 981–993, 2001. <http://doi:10.1099 / 00221287-147-4-981>

LEWIS, G.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Gardens, Kew, p.577,.2005.

LIU, X; YOU, S.; LIU, H.; YUAN, B.; WANG, H.; EUAN K. JAMES, WANG, F.; CAO, W.; LIU, Z. K.; Diversity and Geographic Distribution of Microsymbionts Associated With Invasive Mimosa Species in Southern China. **Frontiersin Microbiology**. v.11, p 563389, 2020. <http://doi:10.3389/fmicb.2020.563389>

LIAO, C. F. H. Devarda's Alloy Method for Total Nitrogen Determination1. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 45, p. 852–855, 1981. <http://doi:10.2136/sssaj1981.03615995004500050005x>

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.

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

LV, Y. Y.; CHEN, M. H.; XIA, F.; WANG, J.; QIU, L.H. Paraburkholderia pallidirosea sp. nov., isolated from the monsoon evergreen broad-leaved forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.4537-4542, 2016. <https://doi: 10.1099/ijsem.0.001387>

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

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. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00215-5).

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of

the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>.

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, 2016. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA15050>.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA: Lavras, 2006.p. 451-459.

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, n. 2, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.010>.

MUNROE, J. W.; ISAAC, M. E. N₂-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Amsterdam, v. 34, n. 2, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-013-0190-5>.

OLIVEIRA, I. S. R.; JESUS, E. C.; RIBEIRO, T. G.; SILVA, M. S. R. A.; TENORIO, J. O.; MARTINS, L. M. V.; FARIA, S. M. *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. adapts to rhizobia populations with differential taxonomy and symbiotic effectiveness outside of its location of origin. **FEMS Microbiology Ecology**. v.95, Edição 8., 2019. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz109>

PARNISKE, M. Uptake of bacteria into living plant cells, the unifying and distinct feature of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology** v.44, p.164-174. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.016>

PEREIRA, I. M.; ANDRADE L. A.; SAMPAIO E. V. S. B.; BARBOSA, M. R. V. Use-history effects on structure and flora of caatinga. **Biotropica** v.35, p154–165, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00275.x>

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research Microbiology**. v.152, 95–103, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4).

PAULITSCH, F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA M. *Paraburkholderia quartelaensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from nodules of *Mimosa gymnas* in a ecotone

considered as a hotspot of biodiversity in Brazil. **Archives of Microbiology**, v.201, p.1435–1446, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01714-z>

PAULITSCH, F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; BATISTA, J.S. Da S.; HUNGRIA, M.; *Paraburkholderia atlantica* sp. nov. and *Paraburkholderia franconis* sp. nov., two new nitrogen-fixing nodulating species isolated from Atlantic forest soils in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 202, p1369–1380, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01843-w>

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

PLATERO, R.; JAMES, E. K.; RIOS, C.; IRIARTE, A.; SANDES, L.; ZABALETA, M.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. **Applied and Environment Microbiology**, v.82, p. 3150–3164, 2016. <https://DOI:10.1128/AEM.04142-15>

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. p.402.

QUEIROZ, L. P.; LAVIN, M. *Coursetia* (Leguminosae) from eastern Brazil: Nuclear ribosomal and Chloroplast DNA sequence analysis reveal the monophyly of three caatinga-inhabiting species. **Systematic Botany**. v.36, p.69–79. 2011. <https://doi.org/10.1600/036364411X553144>.

RAZA A., ZAHRA, N., HAFEEZ, M.B., AHMAD, M., IQBAL, S., SHAUKAT, K., AHMAD, G. Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In: Hasanuzzaman M., Araújo S., Gill S. (eds) *The Plant Family Fabaceae*. **Springer**, Singapore. p.43-74, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_3

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

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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>.

SANTOS, H.G.D; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F; COELHO, M. R; ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Livro técnico, Embrapa Solos, 2018.

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.; FERNANDESJÚNIOR, 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. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.033>.

SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.F.; VIEIRA, I.M.M.B.V.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N.; SANTOS, C. E. R. S. **Microorganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, cap. 1, p. 17-41. 2008.

SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L.; SALCEDO, I. H.; TIESSEN, H. Regeneração da vegetação de caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.33: p.621-632. 1998.

SAMPAIO, E. V. S. B.; FREITAS, A. D. S. **Caatinga**: descrição geral In: Restauração na Caatinga. 1 edição Maceió: Editora da Universidade Federal de Alagoas/EDUFAL, p. 13-38. 2017

SAMPAIO, E. V. S. B.; FREITAS, A. D. S. **Caatinga**: descrição geral In: Restauração na Caatinga. 2 edição, Maceió: Editora da Universidade Federal de Alagoas/EDUFAL, p. 10-26. 2021.

SATURNO, D. F.; ANDRADE, D.S. Diversidade de Rizóbios que Nodulam Bracatinga Isolado de Solos Cultivados e de Floresta. **Uniciências**, São Paulo, v.19, n. 1, p. 26-30, 2015. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2015v19n1p%25p>

SILVA, V. C.; ALVES, P. A. C.; RHEM M. F. K.; SANTOS J. M. F.; JAMES E. K.; GROSS, E. Brazilian species of Calliandra Benth. (tribe Ingeae) are nodulated by diverse strains of Paraburkholderia. **Systematic and Applied Microbiology** v.41, p1–10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.12.003>

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. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100144>.

SILVA, J. M. C.; LANCHER, T. E.; Caatinga—South **America. Encyclopedia of the World's Biomes**. p. 554-561, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11984-0>

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, p.435–441, 2013. <http://doi:10.1099/ij.s.0.039859-0>.

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, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300005>.

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; Prell, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**. v.54, p.1–11. 2005 <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.015>.

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**, v.10 p.100-144. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100144>

SOARES, V. O; ALMEIDA, M. O. O bioma Caatinga sob a percepção da paisagem e a dinâmica da agricultura. **Revista Geográfica de América Central**, Costa Rica. v.2, p. 115. 2011.

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. <https://doi:10.1128/JCM.00770-09>

SUDENE. Relatório de gestão, 2019. <https://www.gov.br/sudene/pt-br>

STACKEBRANDT, E. Defining Taxonomic Ranks. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. (eds) **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006.

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

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. 30 (12), 2725–2729. 2013. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

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

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria**. [s.l.] International Biological Programme/ Blackwell Scientific, 1970.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 17, p. 4153–4154. 1993. <https://doi:10.1093/nar/21.17.4153>

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 4153-4154, 1993. <https://doi:10.1093/nar/21.17.4153>

WATT, P. M.; IAN, D.; HICKSON, I. D. Structure and function of type 11 DNA topoisomerases. *iochem.* **Biomechical Journal** v .303, p.681-695.1994. <https://doi10.1042/bj3030681>

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. <https://doi:10.1128/jb.173.7.2271-2277.1991>