



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – POSAGRO

JOSIMAR DA SILVA CHAVES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE ESTILOSANTES

(Stylosanthes ssp.)

Boa Vista
RORAIMA - BRASIL
2014

JOSIMAR DA SILVA CHAVES

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE ESTILOSANTES**

(Stylosanthes ssp.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima em parceria com a EMBRAPA.

Orientador: Dr. Jerri Edson Zilli

Co-orientadora: Dra. Krisle da Silva

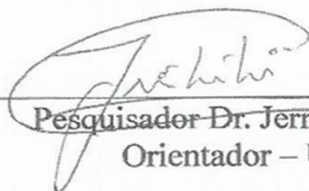
Boa Vista
RORAIMA - BRASIL
2014

JOSIMAR DA SILVA CHAVES

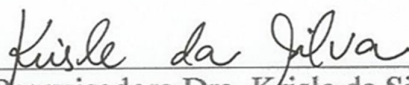
Isolamento, caracterização e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de estilosantes (*Stylosanthes* spp)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

Aprovado: 24 de fevereiro de 2014.



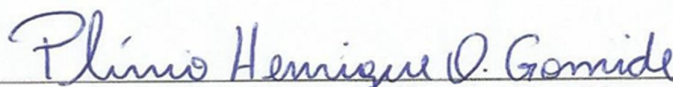
Pesquisador Dr. Jerri Edson Zilli
Orientador – UFRR



Pesquisadora Dra. Krisle da Silva
Embrapa Roraima



Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro Rocha
UFRR



Prof. Dr. Plínio Henrique Oliveira Gomide
UERR

JOSIMAR DA SILVA CHAVES

*A Deus, por me iluminar
e permitir que eu
concluísse mais uma
etapa da minha vida,*

Ofereço

À **Minha Família** que tanto amo, **meus pais**, Bento Sudário Chaves (*In memoriam*), e em especial a minha mãe Maria da Conceição da Silva Chaves.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e por tudo que tenho conseguido;

À **minha Co-orientadora e Orientador**, pela constante orientação e paciência;

À **Universidade Federal de Roraima – UFRR**, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – POSAGRO, pela realização desse Mestrado;

À **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Roraima**, pela parceria na realização do Mestrado;

Ao pesquisador da EMBRAPA-RR, **Vicent Gianluppi** pela enorme contribuição no trabalho;

Ao **Instituto Federal de Ciência e Tecnologia – IFRR**, em especial ao Campus Novo Paraíso, pela compreensão da importância do Mestrado;

Aos **professores da Banca Examinadora**, pela participação e valorosas contribuições a este trabalho;

A **todos os professores do Mestrado em Agronomia**, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos amigos **Cátia Mosqueira, Alexandre Barauana, Ricardo Martel Coffy e Joselma Pedrosa**, pela colaboração, companheirismo e incentivos para a realização do trabalho;

Aos **colegas de turma**, pelo companheirismo e torcida para o êxito;

Aos **funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Roraima**, pelo inestimável auxílio e colaboração na realização dos trabalhos, em especial para as técnicas de laboratório **Aliny Maria Ribeiro de Melo e Eliane do Nascimento Cunha**, A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Agradeço.

BIOGRAFIA

Josimar da Silva Chaves, filho de Bento Sudário Chaves (*In memoriam*) e Maria da Conceição da Silva Chaves, nasceu na cidade de Itaituba, Estado do Pará, em 29 de Novembro de 1976. Concluiu o ensino fundamental na Escola de Ensino Fundamental Joaquim Caetano Corrêa, no ano de 1992, Concluiu o curso Técnico em Contabilidade no Instituto de Educação de Itaituba, no ano de 1995 e cursou o Curso Técnico em Agropecuária, na Escola Estadual Prof^a Maria do Socorro Jacob, concluindo em 1997. Realizou o Curso Técnico em Zootecnia no ano de 1998 na Escola Agrotecnia Federal de Castanhal – Pará e graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Agrárias, pela Universidade Federal do Pará - UFPA, no ano de 2002. Cursou Especialização em Produção de Ruminantes na Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, Minas Gerais, nos anos de 2003 e 2004.

No período de 2003 a 2010 atuou em várias instituições e empresas, tais como Prefeitura Municipal de Itaituba – Pará, Agencia de Defesa Agropecuária do Pará – ADEPARÁ; Escola de Trabalho e Produção de Itaituba – ETPI; Escola Estadual de Educação Tecnológica do Pará – EETEPA; Casa Familiar Rural – CFR - Itaituba – Pará; Centro de Educação Superior do Amazonas – CIESA e atualmente é Professor de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Roraima – IFRR.

Iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, na Universidade Federal de Roraima, em março de 2012, desenvolvendo seu trabalho de pesquisa junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Fixação biológica de nitrogênio	17
2.2. Estudos com bactérias fixadoras de N ₂ na Amazônia	20
2.3. FBN em pastagens consorciadas com leguminosas	21
2.4. O gênero <i>Stylosanthes</i> e a FBN.....	23
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Coleta e identificação de diferentes espécies de estilosantes no Cerrado de Roraima	28
4.2. Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de Estilosantes	29
4.3. Caracterização morfológica cultural	29
4.4. Autenticação dos isolados em feijão-caupi	30
4.5. Eficiência simbiótica em <i>Stylosanthes capitata</i> cv. Lavradeiro.	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Isolamento e caracterização morfológica cultural	34
5.1.1. Isolamento das bactérias	34
5.1.2. Caracterização morfológica cultural	35
5.2. Autenticação por meio da inoculação em feijão-caupi	38
5.3. Eficiência simbiótica de isolados de <i>Stylosanthes</i> ssp.	41
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

8. APÊNDICE	62
Apêndice 8.1. Dendrograma morfológico cultural dos isolados de Estilosantes	62
Apêndice 8.2. Características fenotípicas dos 303 Isolados de Estilosantes.....	65
Apêndice 8.3. Resumo da ANAVA para as variáveis NN, MSN, MSPA e N total.....	66
Apêndice 4. Visão geral do experimento de autenticação em casa de vegetação com feijão caupi. 66	
Apêndice 8.5. Visão geral do experimento de eficiência simbiótica em casa de vegetação, em vasos com solo estéril, utilizando <i>Stylosanthes capitata</i> cv. lavradeiro.	66
Apêndice 8.6. Experimento em casa de vegetação - Comparação do desenvolvimento das plântulas inoculadas. BR446 estirpes recomendadas para estilosantes; (Nitrogenado) planta com N mineral e sem inoculação; (Controle) planta sem inoculação e sem N mineral e (4A29 e F29) planta inoculada com estirpes em estudo.	67
Apêndice 8.7. Autenticação de 89 isolados quanto à nodulação em feijão-caupi, isoladas de nódulos de cinco espécies de estilosantes nativos e cultivados em Roraima.....	68
Apêndice 8.8. Distribuição dos isolados autenticados em feijão caupi em relação à ocorrência de nodulação.....	69
Apêndice 8.9. Identificação das espécies de estilosantes no Cerrado de Roraima.....	70
8.9.1. <i>Stylosanthes capitata</i> Vogel.....	70
8.9.2. <i>Stylosanthes scabra</i> Vogel.....	71
8.9.3. <i>Stylosanthes gracilis</i> Kunth	72
8.9.4. <i>Stylosanthes humilis</i> Kunth.....	73
8.9.5. <i>Stylosanthes angustifolia</i> Vogel.....	73
Anexo 1. Composição da solução de Hoagland e Arnon modificada (¼ força) usada na autenticação em feijão-caupi.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de coleta de plantas de <i>Stylosanthes</i> ssp. No Cerrado de Roraima.....	28
Tabela 2. Composição química e física das amostras de solo antes e após autoclavagens a pressão de 1,5 kg / cm ⁻² , a 127 °C, por 20 minutos.....	32
Tabela 3. Análise química e granulométrica das amostras de solo, dos diferentes pontos de coleta de plantas de estilosantes no Cerrado de Roraima.....	35
Tabela 4. Principais características culturais dos 44 isolados de <i>Stylosanthes</i> ssp. que estabeleceram simbiose com o feijão caupi	39
Tabela 5. Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total em plantas de <i>Stylosanthes capitata</i> cv.lavradeiro de 44 isolados, um controle positivo (BR446) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem N).....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição quantitativa de nódulos e isolados bacterianos obtidos de *Stylosanthes* ssp. coletados em dois municípios do Estado de Roraima 34
- Figura 2.** Tempo de crescimento dos isolados de espécies de estilosantes do Cerrado de Roraima 36
- Figura 3.** Reação de alteração do pH em meio 79 contendo azul de bromotimol dos isolados de espécies de estilosantes coletadas no Cerrado de Roraima..... 36

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Características fenotípicas culturais (pH e tempo de crescimento) dos 44 isolados das cinco espécies de *Stylosanthes* ssp. que realizaram simbiose com feijão caupi.....41

RESUMO

CHAVES, Josimar da Silva. Isolamento, caracterização e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de Estilosantes (*Stylosanthes* spp.). 2014. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima – UFRR.

Entre as leguminosas forrageiras potencialmente importantes para as condições edafoclimáticas do Brasil, o gênero *Stylosanthes* destaca-se como alternativa para a melhoria da fertilidade do solo em pastagens consorciadas com gramíneas, tanto pela sua adaptação ao sistema quanto pela capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a eficiência na fixação biológica de nitrogênio por bactérias isoladas de nódulos de estilosantes (*Stylosanthes* spp.). Foram realizadas coletas de plantas de *Stylosanthes* spp. em dois municípios de Roraima (Boa Vista e Bonfim), sendo exsicatas das plantas enviadas para identificação botânica no Museu Integrado de Roraima. As raízes das plantas foram lavadas com água e ao todo 564 nódulos foram coletados e isolados em meio de cultura YMA. Adicionalmente, também foram utilizados no estudo 34 isolados que haviam sido obtidos previamente de *Stylosanthes* sp. Após a purificação, os isolados foram morfológicamente caracterizados em meio YMA, considerando-se o tempo de crescimento, alteração do pH no meio de cultura, forma e aspecto das colônias e muco. Realizou-se então um agrupamento dos isolados utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Em seguida, conduziu-se um experimento pelo período de 20 dias para a autenticação de 89 isolados de rizóbio em experimento de casa de vegetação inoculando-se plantas de feijão-caupi. Os isolados foram selecionados por representarem os grupos morfológicos das bactérias e, também, as espécies de *Stylosanthes* de onde haviam sido obtidos. Quarenta e quatro isolados que nodularam o feijão-caupi foram posteriormente utilizados para o estudo da eficiência simbiótica em *Stylosanthes capitata* cv. lavradeiro. Este experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando-se a estirpe BR BR 446 (recomendada para o *Stylosanthes*) como controle positivo, além de um tratamento nitrogenado (180,75mg / N por semana) e um controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral. O plantio foi realizado em potes contendo uma mistura de areia e solo (1:1) autoclavados e semanalmente aplicou-se solução nutritiva e água quando necessário. A coleta foi realizada aos 65 dias após a emergência das plantas e foram avaliados número e massa de nódulos secos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio acumulado na parte aérea. Dos 564 nódulos foram obtidos 258 isolados que somados aos demais 34 isolados (anteriormente obtidos) totalizaram 292. Os isolados apresentaram grande diversidade morfológica e foram agrupados em 87 grupos com 70% de similaridade. A maioria dos isolados 46% apresentou

característica de crescimento rápido em meio de cultura YMA e apenas 0,7% com crescimento lento. A autenticação indicou que apenas 44 das 89 bactérias testadas formaram nódulos em feijão-caupi, sendo na sua maioria bactérias de crescimento rápido. Isto indica que possa haver especificidade de nodulação entre os isolados de rizóbio e as espécies de estilosantes e diverge da literatura que indica que estilosantes preferencialmente nodula com bactérias de crescimento lento. O experimento de eficiência simbiótica indicou que cerca de 50% dos isolados proporcionaram número de nódulos em *Stylosanthes capitata* igual à estirpe recomendada e proporcionaram produção de matéria seca da parte aérea com tendência superior ao tratamento nitrogenado e a estirpe recomendada. As estirpes St4A29, StG57, St1A8, StF29 e St6E2-3 apresentaram melhor desempenho e possuem potencial para futuras pesquisas de recomendação de estirpes.

Palavras-chaves: *Stylosanthes*; isolados; fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

CHAVES, Josimar da Silva. Isolation, characterization and symbiotic efficiency of nitrogen - fixing bacteria isolated from (*Stylosanthes* spp.). 2014. 75p. Dissertation (MSc in Agronomy) - Federal University of Roraima - UFRR.

Among potentially important forage legumes for edaphoclimatic conditions in Brazil, the genus *Stylosanthes* appears as alternative for improving the soil fertility in consortium with grasses, both by the adaptation to the system as well as the ability to establish symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. The aim of this study was isolate, characterize and assess the biological nitrogen fixation efficiency of the bacterial isolated from nodules of *Stylosanthes* spp. Samplings of *Stylosanthes* spp. plants were taken from two municipalities of Roraima State (Boa Vista and Bonfim), and plant's exsiccates were sent for botanical identification at Integrated Museum of Roraima. The plant's roots were washed with water and a total of 564 nodules were collected and isolated on YMA medium. Additionally, 34 isolates previously obtained from *Stylosanthes* sp. were also included in the study. After purification, the isolates were morphologically characterized, considering the time to growth, culture medium pH reaction, shape and aspect of the colonies and mucus. A clustering analysis was further performed with the Jaccard index. An authentication experiment was carried on during 20 days in glasshouse with 89 isolates inoculated in cowpea. The isolates were selected based on morphological groups and also *Stylosanthes* species that they had been isolated. Forty-four isolates that nodulated cowpea were after used for symbiotic efficiency evaluation in *Stylosanthes capitata* (cv. Lavradeiro). This experiment was performed in glasshouse where it was used the strain BR 446 (indicated for *Stylosanthes* inoculation) as positive control, besides a treatment with nitrogen (180,75mg / N per week) and a control without inoculation or nitrogen. The sowing was done in pots containing a mixture of sand and soil (1:1) autoclaved. Harvest was done 65 days after plant germination and were evaluated the nodules number and dry mass, plant dry matter and nitrogen accumulation in the dry matter. From 564 nodules, 258 isolated were purified and, with the additional 34 isolates (previously obtained), 292 isolates were consider for the study. The isolates showed high morphological diversity and were clustered in 87 groups, with threshold 70%. Most of the isolates 46% presented fast growing on YMA medium and only 0,7% were slow-growing. The authentication revealed that 44 of the 89 bacteria tested were able to form nodules in cowpea, and most of this isolates were fast-growing. This result indicated that could exist nodulation specificity between rhizobium isolates and *Stylosanthes* species, and diverge of the previous observations that had indicated *Stylosanthes* as mainly nodulated by slow-growing bacteria. Symbiotic efficiency

experiment indicated that about 50% of the isolates were able to form nodules in *Stylosanthes capitata* similar to recommend strain and trend to higher contribution for biomass production was observed in comparison with nitrogen treatment and recommended strain as well. The strains St4A29, StG57, St1A8, StF29 and St6E2-3 have shown best performance and have potential for future researches to strains recommendation.

Keywords: *Stylosanthes*; isolated; biological nitrogen fixation.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de insumos biológicos em substituição aos insumos químicos tem sido cada vez mais frequente na agricultura. Neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem-se mostrado indispensável para a sustentabilidade da agricultura brasileira, por meio do fornecimento de nitrogênio às culturas com baixo custo econômico e redução dos impactos ambientais (HUNGRIA, CAMPO e MENDES, 2007).

As leguminosas possuem importância econômica e ecológica, e seu sucesso é atribuído aos métodos de defesa, de reprodução e principalmente, a capacidade de adquirir substâncias essenciais de crescimento (POLHILL e RAVEN, 1981). Uma característica marcante dos membros desta família é a simbiose em suas raízes com rizóbios, que permite a fixação de nitrogênio atmosférico (FARIA *et al.*, 2001).

A FBN é um processo natural sendo mediado por uma ampla gama de microrganismos procariotos, com substancial diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os organismos responsáveis pela FBN são encontrados em vários ambientes, vivendo livremente ou associados a outros seres vivos, como por exemplo, em simbiose com leguminosas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Quando em simbiose, estabelece-se uma relação mutualística entre o microssimbionte e a planta, em que o microrganismo fornece o nitrogênio à planta e esta, em contrapartida, a supre com carboidratos (CASSINI e FRANCO, 2006).

O processo de simbiose em leguminosas ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas nódulos, que é formado no sistema radicular. As bactérias fixadoras de nitrogênio, na forma de bacteróide, convertem o N₂ atmosférico em amônia, através do complexo enzimático da nitrogenase que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pelas plantas (ARAÚJO e CARVALHO, 2006).

Estima-se que a FBN contribua com a maior parte do N fixado anualmente, cerca de 175 milhões de toneladas, ou seja, 70 % do total, tornando o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A sua exploração na produção agrícola representa cerca de 30% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento das culturas. Desta forma, contribuindo para o aumento da produção vegetal, recuperação de áreas degradadas, incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo (GALLOWAY *et al.*, 2003).

As plantas forrageiras constituem a base da alimentação do rebanho bovino brasileiro, constituindo alimento de baixo custo. Esta característica do sistema de produção o torna

competitivo no mundo, mas, essa característica só é possível se áreas de pastagens forem produtivas e o sistema de produção sustentável.

A utilização de leguminosas nas pastagens constitui um dos meios mais importantes e econômicos de adicionar nitrogênio ao sistema solo-planta-animal. Cerca de 50% dos 100 milhões de hectares ocupados com pastagens cultivadas no Brasil encontra-se em algum estágio de degradação (DUBEUX *et al.*, 2006). A não reposição de nutrientes, dentre eles o nitrogênio, é um dos fatores responsáveis por tal quadro. Desta forma, a introdução de leguminosas forrageiras representa uma alternativa de elevar efetivamente a fertilidade do solo, através da incorporação anual, de grandes quantidades de N, com a consequente estimulação na reciclagem de outros nutrientes.

Silva e Zimmer (2004) verificaram que a consorciação de espécies de *Stylosanthes* com determinadas gramíneas pode ser utilizada na recuperação de áreas degradadas, procedimento este que já é utilizado em países como Colômbia e Venezuela. O potencial do gênero está sendo testado em países como África do Sul, Nigéria e Camarões, sendo utilizado para melhoria da alimentação de bovinos, recuperação de terras, controle de plantas daninhas e explorado em rotação de culturas, (THOMAS, 1984; DORNELAS *et al.*, 1991; GONZÁLES *et al.*, 2000; QUECINI *et al.*, 2002; GONELA *et al.*, 2004; COSTA, 2004; TARAWALI *et al.*, 2005; MOCHIUTTI *et al.*, 2005).

O gênero *Stylosanthes* pertence à família Fabaceae, inclui 50 espécies e um grande número de subespécies, ocorrendo naturalmente nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas das Américas, África tropical e sudeste da Ásia (TARAWALI *et al.*, 2005). O Brasil apresenta o maior número de espécies deste gênero cerca de 29 (MILES e LASCANO, 1997; LEWIS *et al.*, 2005; COSTA, 2006). As espécies do gênero *Stylosanthes* estão entre as mais importantes leguminosas forrageiras destacando-se por sua resistência à seca, adaptação a solos ácidos e com baixa fertilidade natural (GUODÃO *et al.*, 1997).

Fernandes (2003) relata que, no Brasil, o *Stylosanthes* se destaca entre as leguminosas forrageiras tropicais com melhor potencial de uso, seja como banco de proteínas ou em consorciação com alguns gêneros de Poaceae. Porém, apesar de sua ampla ocorrência em diferentes continentes, não há dados na literatura sobre a diversidade de rizóbios em simbiose com esta leguminosa justificando o estudo de isolamento e seleção de bactérias fixadoras de N₂ com esta leguminosa. Em estudo conduzido na Austrália, os rizóbios são relatados como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (DATE, 2010).

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar, caracterizar e avaliar a eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio de bactérias isoladas de *Stylosanthes* nativos e cultivados no Estado de Roraima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO e DÖBEREINER, 1994). Além do carbono e hidrogênio, o nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável e, portanto sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação. Portanto, considerando que a atmosfera terrestre é composta de 78% de gás dinitrogênio, a introdução do nitrogênio atmosférico, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), no circuito dos ciclos biogeoquímicos tem frequentemente efeitos positivos no ambiente e na economia (STACEY *et al.*, 1992).

Apesar da abundância de N_2 na atmosfera terrestre, os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos (plantas e animais) não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células (JARAMILLO, 2010). Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Os rizóbios ou bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas são principalmente α -proteobactérias e β -proteobactérias gram-negativas, aeróbicas obrigatórias, sem endósporos, capazes de promover a formação de estruturas hipertróficas corticais em raízes, e excepcionalmente no caule, denominadas de nódulos (XAVIER *et al.*, 2006). Este processo é uma relação simbiótica de protocooperação ou mutualista (BONTEMPS *et al.*, 2009), em que as bactérias fornecem o nitrogênio através da atividade do complexo enzimático denominado nitrogenase. Este complexo possui a capacidade de quebrar a tripla ligação entre as moléculas do gás nitrogênio (N_2) tornando mais reativo e possibilitando a conversão para a uma das formas assimiláveis pelas plantas, (NH_3). Em resposta a FBN, as

plantas translocam açúcares sintetizados no processo de fotossíntese até as raízes, mantendo os bacteróides que se encontram no interior dos nódulos.

A FBN é mediada por uma parcela de procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Estes microrganismos podem viver livres no solo ou na água, na superfície das raízes e folhas das plantas, nos intestinos dos animais, ocupar espaços inter ou intracelulares ou mesmo causando mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas (SIQUEIRA e FRANCO, 1988; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Com este processo, os organismos vivos conseguem aproveitar o N₂ atmosférico, incorporando-o à biosfera. Em termos de importância agrícola, a simbiose rizóbio - leguminosa é considerada a de maior importância.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos para a manutenção da vida na terra, pois ele contribui com cerca de 70% de todo o nitrogênio requerido por ecossistemas naturais e agrícolas, além de ambientalmente seguro (MOREIRA, HUISING e BIGNELL, 2010). Na agricultura, é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (KYEIBOAHEN *et al.*, 2002; SANGINGA, 2003), bem como na Amazônia (HARA; OLIVEIRA, 2005). Um melhor entendimento da associação rizóbio-leguminosa nas condições ácidas e de baixa fertilidade dos solos da Amazônia pode prover uma contribuição efetiva no balanço de nitrogênio tanto no solo como nas plantas.

A eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio, que estabelecem simbiose com leguminosas, e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos no solo depende de fatores genéticos inerentes aos simbiossiontes e da interação com fatores edafoclimáticos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Em condições de clima tropical, os principais fatores abióticos que afetam o potencial da fixação biológica de nitrogênio são: temperatura, acidez e toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo (THIES *et al.*, 1991).

Sabe-se que da diversidade total conhece-se apenas 50%, e que boa parte encontra-se nas florestas tropicais (MOREIRA *et al.*, 1993; PEREIRA, 2000), adaptados a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), cujo imenso potencial ainda tem muito a se conhecer.

A intensificação da interferência antropogênica resulta na perda e alteração da diversidade, acima e abaixo do solo, influenciando em processos biológicos importantes para o bom funcionamento do ecossistema (LIMA *et al.*, 2005). Pela sua diversidade e dinâmica, e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, os

microrganismos constituem indicadores sensíveis às mudanças oriundas do manejo do solo (KENNEDY e PAPENDICK, 1995) e do tipo de cobertura vegetal (PRASAD *et al.*, 1994).

Dentre as formas de acessar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, técnicas como a caracterização cultural permite avaliar a diversidade fenotípica dos microrganismos sendo muito utilizada por ser de fácil execução e de baixo custo. Porém, estima-se que apenas 1% dos microrganismos seja cultivável em meio de cultura (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), o que torna limitante esta técnica. Esta, contudo, não é uma limitação no caso das bactérias formadoras de nódulos que são conhecidas de forma geral como rizóbios, pois as mesmas crescem facilmente em meio de cultura (MOREIRA *et al.*, 2008).

Em estudos de diversidade realizados por JESUS *et al.*, (2005) e NÓBREGA (2006) foi demonstrado que o uso do método de caracterização cultural é indicado para agrupamento inicial, principalmente quando se trabalha com um número muito grande de isolados. Representantes desses grupos podem ser caracterizados com técnicas mais discriminativas, genética e fenotipicamente. Desta forma, a caracterização e a eficiência das estirpes nativas na fixação biológica de N₂, representam condições essenciais para o desenvolvimento de estudos de competitividade que indicarão a possibilidade de sucesso de inoculação desta leguminosa forrageira.

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com propósito prático de inoculação em leguminosas têm sido objeto de muitos estudos (NEVES *et al.*, 1998a,b; HUNGRIA *et al.*, 2001; HARA e OLIVEIRA, 2005; ZAMAN-ALLAH *et al.*, 2007; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Esta seleção de estirpes eficientes para a FBN em leguminosas deve objetivar estirpes eficientes e competitivas frente à população nativa e apresentar vários aspectos agrônômicos e culturais, tais como: potencial de nodulação, estabilidade genética, fixação de N₂ e crescimento da planta hospedeira (LIMA *et al.*, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ZILLI *et al.*, 2006; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010).

A seleção de novas estirpes, capazes de fixar maiores quantidades de N₂ quando em simbiose com leguminosas, é extremamente importante para a produção de inoculantes. No entanto, as estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, em decorrência, entre outros fatores, da competição com a população nativa estabelecida do solo e da adaptação às condições ambientais locais, tornando-se necessário também o estudo de densidade e diversidade da população de rizóbios nativos (SOARES *et al.*, 2006).

O número e a biomassa de nódulos, massa seca da parte aérea e nitrogênio total no tecido vegetal são indicadores usuais da FBN (FERREIRA e CASTRO, 1995) e constituem

critérios utilizados para avaliação da simbiose rizóbio – leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (Brasil, 2011-Protocolo do MAPA).

Os estudos de coleta, isolamento, caracterização fenotípica e genética de estirpes isoladas em leguminosas, são de fundamental importância para o entendimento do processo de FBN realizados por rizóbios nativos, principalmente em regiões como a Amazônia brasileira, onde ainda foram realizados poucos estudos.

2.2. Estudos com bactérias fixadoras de N₂ na Amazônia

A Amazônia brasileira abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, o que corresponde a 60% do território nacional, com 5.000.000 Km², aproximadamente (MENDONÇA-SANTOS *et al.*, 2008). Situado no extremo Norte do Brasil, o Estado de Roraima possui uma superfície territorial de 225.116 Km², representando 2,64% do território nacional e 5,81% da região Norte. É constituído por três grandes biomas, o domínio das florestas, as Campinaranas e o domínio das Savanas. Esses ambientes apresentam características distintas quanto aos aspectos geológicos, geomorfológicos, pedologia e de vegetação. As savanas ocupam uma área de aproximadamente 43.000 Km², situadas na porção central do estado (VALE JUNIOR e SCHAEFER, 2010).

Muitos estudos sobre a diversidade da fauna e flora da Amazônia são encontrados na literatura, porém, pouco se sabe sobre a microbiota do solo. Os trabalhos que vêm sendo realizados têm demonstrado alta diversidade de procariotos nos solos da região amazônica (MOREIRA, 1991; BORNEMAN e TRIPLETT, 1997; PEREIRA, 2000; NÓBREGA, 2006; JESUS *et al.*, 2005; 2009; LIMA *et al.*, 2005; 2009). Trabalhos realizados por Moreira (1991; 1993), mostraram alta diversidade fenotípica entre os isolados oriundos da Amazônia. Moreira *et al.* (1998), realizaram o sequenciamento do gene rDNA 16S de 44 isolados. Como resultados, estes autores obtiveram 15 sequências diferentes, com possibilidade de 6 novas espécies. A partir deste trabalho, foram descritas espécies como *Mesorhizobium plurifarium* (LAJUDIE *et al.*, 1998) e *Azorhizobium dobereiner* (MOREIRA *et al.*, 2006). Borneman e Triplett (1997), avaliando a diversidade microbiana de solos da Amazônia em áreas de pastagem e floresta, comprovaram a grande diversidade de microrganismos na floresta Amazônica que ainda são desconhecidos, por não serem cultiváveis em meios de culturas usados atualmente. Jesus *et al.* (2005), verificaram alta diversidade fenotípica em solos sob

três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental (cultivo de mandioca, cultivo de pupunheira e floresta de terra firme).

Lima *et al.* (2009), avaliaram o efeito de diferentes sistemas de uso da terra (SUT): agrofloresta, pastagem, floresta primária, agricultura, floresta secundária em estágio avançado de regeneração e floresta secundária em estágio inicial de regeneração, na Amazônia Ocidental, sobre a ocorrência, a densidade, a diversidade e a eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular raízes de siratro (*Macropodium atropurpureum*). Os autores verificaram a presença de bactérias capazes de nodular siratro em solos de todos os SUT, tendo o sistema de uso da terra agrofloresta apresentado maior densidade e diversidade. Em relação à eficiência simbiótica, os isolados apresentaram baixa, média e alta eficiência na fixação de nitrogênio, independente do SUT. Resultados semelhantes foram verificados por Nóbrega (2006), estudando a ocorrência e a diversidade fenotípica de bactérias que nodulam feijão-caupi nos diferentes SUT, demonstrando alta diversidade fenotípica dos isolados. Além disso, observou que o SUT afeta a diversidade de bactérias.

Jesus *et al.* (2009), analisando a comunidade bacteriana do solo pela técnica de T-RFLP, clonagem e sequenciamento do gene rDNA 16S em seis diferentes SUTs, verificaram alta diversidade das comunidades. Em solos sob o SUT pastagem, observaram-se comunidades com maior diversidade. Os autores observaram que essa diversidade estava relacionada com fatores edáficos, corroborando resultados encontrados por Pereira (2000), o qual, avaliando o efeito do sistema de manejo na diversidade de rizóbios no solo, também observou maior diversidade cultural em áreas de pastagem.

Portanto, a região amazônica possui uma elevada diversidade de procariontos, que precisa ser investigada, principalmente bactérias fixadoras de nitrogênio, que podem ter potencial para uso como inoculante em diversas culturas.

2.3. FBN em pastagens consorciadas com leguminosas

A baixa fertilidade natural dos solos é fator limitante da produtividade e sustentabilidade das pastagens tropicais, assim como o manejo que também pode acentuar a deficiência de nutrientes, especialmente o nitrogênio. Na fase de utilização das mesmas, o baixo suprimento de nitrogênio tem conduzido à perda de sustentabilidade e degradação das pastagens. Estima-se que mais de 100 milhões de ha ocupados com pastagem cultivadas no Brasil, cerca de 50% a 70% do total, apresente algum grau de degradação (BARCELLOS, 1996; DUBEUX *et al.*, 2006; DIAS-FILHO, 2011), sendo esta realidade comum tanto para campos nativos, quanto pastagens plantadas.

O processo de degradação da pastagem é fenômeno complexo que envolve causas e consequências que levam a perda gradativa da matéria orgânica do solo, à diminuição da capacidade de suporte animal, culminando com a degradação propriamente dita (DIAS-FILHO, 2011). No entanto, no Brasil a degradação ocorre principalmente pela falta de manutenção da fertilidade do solo, sendo o nitrogênio um dos nutrientes mais limitantes (OLIVEIRA *et al.*, 1997).

O aumento do suprimento de N no solo, na melhoria da produtividade das gramíneas, pode ser obtido pela aplicação de fertilizantes nitrogenados ou pelo uso de leguminosas em consorciação com gramíneas, por causa da capacidade dessas plantas em fixar biologicamente o N atmosférico. Valores de até 180 kg / ha⁻¹ de N durante um período de 90 dias, no período chuvoso, foram encontrados em estilosantes em região de Cerrado (MIRANDA *et al.*, 2009). Silva *et al.*, (2010), relata contribuição da fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias diazotróficas nas pastagens de 10 a 42%, em comparação a áreas sem presença de leguminosas. Desta forma, a introdução de leguminosas forrageiras representa uma alternativa de elevar efetivamente a fertilidade do solo, através da incorporação anual, de grandes quantidades de N, com a consequente estimulação na reciclagem de outros nutrientes.

Estima-se, que existam mais de 300 mil ha de áreas com pastagens em Roraima (DIAS-FILHO e ANDRADE, 2005); sendo a maioria delas com baixa produtividade animal, devido às características do solo e período de estiagem prolongado. Portanto, é necessária a busca por alternativas de manejos que possibilitem o aumento da capacidade produtiva de pastagens nessa região.

A importância das leguminosas forrageiras nas pastagens cultivadas na Amazônia Ocidental (Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima) é bastante variada. Enquanto no Acre estima-se que as leguminosas (plantadas e de ocorrência espontânea) estejam presentes em 45% das pastagens cultivadas, o mesmo só ocorre em 2% das pastagens de Roraima (DIAS-FILHO e ANDRADE, 2005).

Outro aspecto importante para estudos de eficiência simbiótica e seleção de bactérias é que metade das áreas de pastagem no Brasil encontra-se degradada e o consórcio de gramíneas com leguminosas forrageiras fixadoras de nitrogênio pode diminuir a taxa de degradação. Ao mesmo tempo, o consórcio possibilita um incremento nos estoques de carbono no solo ao custo de CO₂ atmosférico, podendo ajudar na mitigação do efeito estufa (DIAS-FILHO, 2011). Portanto, é de extrema importância conhecer a diversidade de rizóbios em simbiose com *Stylosanthes*. Este conhecimento da diversidade é fundamental para

compreender a relação entre os simbioses, isto é, planta hospedeira e rizóbio, além disso, direciona os estudos de eficiência simbiótica.

O uso de leguminosas forrageiras em consórcio ou em banco de proteínas pode contribuir para a sustentabilidade da mesma, além de aumentar a produtividade, através do processo de FBN, principalmente em Roraima, no qual o emprego de pastagens consorciadas é baixo.

2.4. O gênero *Stylosanthes* e a FBN

Entre as leguminosas forrageiras que estabelecem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (rizóbios) merece destaque o gênero *Stylosanthes*. O gênero compreende cerca de 50 espécies e subespécies nativas de áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Oceania e das Américas, principalmente da América do Sul, apresentando grande variação de formas e tipos (QUECINI *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 2005). Sendo o Brasil o maior centro de diversidade desta leguminosa, concentrando cerca de 58% das espécies do gênero (COSTA, 2006), com grande endemismo e a maior variação fenotípica inter e intraespecífica (COSTA e FERREIRA, 1984), seguido do México e região do Caribe (STACE e CAMERON, 1984). No Brasil ocorrem 29 espécies, sendo que destas 13 são endêmicas (COSTA, 2006), principalmente no Cerrado (BRANDÃO e COSTA, 1979).

O gênero *Stylosanthes* foi descrito em 1788 por Swartz, com duas espécies, *S. procumbens* Swartz (= *S. hamata* (L.) Taubert) e *S. viscosa* Swartz. Em 1838, Vogel estudou o gênero dividindo-o em duas seções, *Eustylosanthes* e *Styposanthes* (BRANDÃO e COSTA, 1982; KIRKBRIDE Jr. e KIRKBRIDE, 1987). Mohlenbrock (1958) efetuou a revisão do gênero, reconhecendo 25 espécies, as quais agruparam em duas seções: *Stylosanthes* (14 spp.) e *Astyposanthes* (11 spp.). Posteriormente, novas adições foram efetuadas por Mohlenbrock (1963) no gênero com acréscimo de novos táxons, distribuídas pela América do Sul, África e Austrália.

Atualmente, as espécies de *Stylosanthes* são separadas em duas seções, *Stylosanthes* e *Styposanthes* com base na presença ou ausência de um eixo rudimentar plumoso na base das flores e posteriormente dos frutos. Representantes da seção *Styposanthes* Vogel possuem eixo rudimentar plumoso e apresentam três bractéolas uma externa e duas internas, na seção *Stylosanthes* não ocorre o eixo rudimentar plumoso e estão presentes duas bractéolas, uma interna e outra externa (MOHLENBROCK, 1958; 1963; KIRKBRIDE Jr. e KIRKBRIDE, 1987; COSTA, 2006).

O gênero *Stylosanthes* apresenta em sua maioria espécies diplóides ($2n=20$), como *Stylosanthes guianensis*, *Stylosanthes humilis*, *Stylosanthes macrocephala* e *Stylosanthes*

viscosa, entretanto, algumas são alotetraplóides ($4n=40$), por exemplo, *Stylosanthes scabra*, *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes fruticosa* (STACE e EDYE, 1984), e também espécie alohexaplóide ($6n=60$), *Stylosanthes erecta* (STACE e CAMERON; 1984). O sistema de reprodução ocorre preferencialmente por autofecundação, com taxa de polinização cruzada da ordem de 2% a 6% em condições naturais (STACE, 1984; MILES, 1985).

O gênero *Stylosanthes* pertence à tribo Dalbergieae, que abrange espécies arbóreas e herbáceas (LEWIS *et al.*, 2005). Nessa classificação foram agrupadas na tribo representantes que possuem microorganismos fixadores de nitrogênio. A maioria das espécies é perene, com sistema radicular pivotante, tolerante à seca e de grande capacidade colonizadora por sua adaptação a solo de baixa fertilidade e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (ANDRADE e KIRIA, 2000; BARROS *et al.*, 2005). Seu porte é prostrado a ereto, podendo alcançar até 1,5 m, apresenta folhas trifolialadas, flores pequenas com grande diversidade morfológica e agrônômica (FERREIRA e COSTA, 1979; SCHULTZE-KRAFT *et al.*, 1984; STACE e EDYE, 1984; BARROS *et al.*, 2005).

Dentre os estudos taxonômicos realizados com *Stylosanthes* no Brasil destacam-se os de Brandão e Costa (1979) e Costa (2006). No Brasil, *Stylosanthes* foi estudado em diferentes levantamentos regionais tais como por Brandão e Costa (1982) para Minas Gerais, Lewis (1987) para Bahia, Kiria *et al.*, (2002) no Cerrado e por Sousa *et al.*, (2003) para o Ceará.

No Brasil muitas espécies de *Stylosanthes* são encontradas no Cerrado, onde são adaptadas aos solos de pH baixo, alto nível de alumínio saturado e baixa fertilidade. A composição específica de *Stylosanthes* é variável por Estado, sendo verificadas 18 espécies para Minas Gerais (BRANDÃO e COSTA, 1982), 9 para a Bahia (LEWIS, 1987); 7 para o Ceará (SOUSA *et al.*, 2003), e entre 7 e 9 para Mato Grosso do Sul (BRANDÃO e COSTA, 1979; DUBS, 1998; COSTA *et al.*, 2008).

O gênero *Stylosanthes* tem se destacado entre as leguminosas forrageiras tropicais, devido as cultivares utilizada como pastagens (SILVA e ZIMMER, 2004). No Brasil, a Embrapa, através das espécies *S. macrocephala* e *S. capitata* desenvolveu a cultivar (cv.) Estilosantes Campo Grande; de *S. guianensis* as cultivares (cvs.) Bandeirantes e Mineirão; de *S. macrocephala* a cv. Pioneiro, e de *S. capitata* a cv. Lavradeiro (GIANLUPPI *et al.*, 2002; TARAWALLI, 2005).

Atualmente a utilização agrônômica se restringe a três espécies, *Stylosanthes capitata*, *Stylosanthes macrocephala* e *Stylosanthes guianensis*, que apresentam maior potencial agrônômico em avaliações conduzidas nos últimos trinta anos, especialmente na região do Cerrado (KIRIA e ANDRADE, 1996). *Stylosanthes guianensis* é a espécie que possui

distribuição mais ampla, sendo encontrado em 16 estados brasileiros (FERREIRA e COSTA, 1979; COSTA e FERREIRA, 1984; COSTA, 2006).

Espécies de *Stylosanthes* geralmente apresentam nodulação espontânea e apresentam ganhos significativos devido à fixação biológica de nitrogênio em resposta a simbioses nativos nos solos brasileiros (MIRANDA *et al.*, 1999). Tal fato limitou estudos e melhorias nesta área no Brasil, que são restritos àqueles feitos nas décadas de 1970-1980. Vale mencionar também, que há poucos estudos brasileiros envolvendo prospecção de rizóbios brasileiros nativos. Em vários estudos menciona-se o uso de inoculantes compostos de ‘rizóbios’, previamente selecionados na Austrália ou na Colômbia, sem maiores detalhamentos (VARGAS e SUHET, 1981; XAVIER *et al.*, 1990) ou apresenta-se dados incompletos. Independente disso, Sá *et al.*, (1983), em condições controladas, testando 122 isolados de rizóbios brasileiros nativos, demonstraram haver condições para melhorias nos níveis de FBN em *S. guianensis*, enquanto ESCUDER (1982) demonstrou que a inoculação de uma estirpe eficiente em FBN aumentou em mais de 10% sua produção de massa seca e N.

Os primeiros e mais abrangentes estudos de prospecção de rizóbios, direcionados a investigar a viabilidade da inoculação de *Stylosanthes* spp. foram realizados na Austrália, muitos deles baseados em isolados de rizóbio coletados em diferentes estados brasileiros (‘T MANNETJE, 1969; DATE e NORRIS, 1979; DATE *et al.*, 1979; DATE, 1984; DATE, 2010 e DATE e EAGLES, 2010). A partir destes estudos, verificou-se que o *Stylosanthes* pode ser dividido em dois grupos quanto sua especificidade para nodulação e efetiva FBN (DATE, 1984; 2010). O primeiro grupo são as espécies de *Stylosanthes* que podem ser noduladas efetivamente por uma ampla faixa de rizóbios (planta considerada promíscua), representada por *Stylosanthes erecta*; e o segundo por requerer um rizóbio específico (*S. capitata*, *S. guianensis*, *S. macrocephala*, *S. hamata* e *S. glandifolia*) (SANTOS *et al.*, 2007).

Segundo VARGAS e HUNGRIA (1997), o gênero *Stylosanthes* possui especificidade hospedeira em algumas espécies desse gênero em relação à fixação biológica de N₂. Trabalhos conduzidos em vasos, em condições assépticas, com estirpes nativas isoladas de solos do Cerrado, comprovaram essas especificidades em *Stylosanthes glandifolia* e *Stylosanthes guianensis* (SÁ *et al.*, 1983).

Os fatores determinantes na promiscuidade ou especificidade podem estar relacionados às características da planta e também sua origem. Por exemplo, informações relacionadas ao solo e clima de origem de acessos de estilósantes que foram avaliados quanto sua resposta a inoculação com rizóbios sugerem uma relação entre eficiência e pH do solo e/ou clima de origem dos acessos (DATE *et al.*, 1979). Em experimentos conduzidos por 15

anos na Austrália sobre a efetividade de diversas estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em *S. hamata* e *S. seabrana*, verificou-se que os acessos vegetais mais promíscuos foram oriundos de ambientes mais úmidos e com pH abaixo de 7, enquanto que rizóbios específicos foram requeridos em grupos oriundos de ambientes mais secos e levemente alcalinos (DATE, 2010). Além disso, considerando a característica da planta, verificou-se que os acessos mais promíscuos foram os tetraplóides e os mais específicos os diplóides.

Apesar de sua ampla ocorrência em diferentes continentes, há pouca informação na literatura sobre a diversidade de rizóbios em simbiose com esta leguminosa. Em estudo conduzido na Austrália, incluindo materiais coletados no Brasil, os rizóbios são relatados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (DATE, 2010). Assim, justificam-se estudos de caracterização de rizóbios em simbiose com esta leguminosa.

No Brasil atualmente são recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) duas estirpes de bactérias para inoculação de estilosantes, a BR 446 e BR 502, ambas do gênero *Bradyrhizobium* (MAPA, 2006). No entanto, não se tem informações precisas da origem destas estirpes e nem do processo de seleção. Portanto, o conhecimento da diversidade é fundamental para compreender a relação entre os simbioses, isto é, planta hospedeira e rizóbio, além disso, direciona os estudos de eficiência simbiótica.

Das leguminosas forrageiras nativas do Brasil, o gênero *Stylosanthes* destaca-se com uma ampla adaptação e resistência de pressões bióticas e abióticas. Existe no mundo todo, um número muito grande de leguminosas forrageiras, em pastagens naturais e cultivadas (ARAÚJO, DEMINICIS e CAMPOS, 2008). A Austrália é um dos países, que vem estudando esses tipos de leguminosas, possuindo uma antiga tradição na área de pesquisa com este gênero. No Brasil, embora o reconhecimento do gênero *Stylosanthes* como forrageira tenha ocorrido na década de 40, apenas no ano 2000, foram liberadas as primeiras variedades selecionadas para a comercialização (LAZARO, 2007).

Apesar de sua grande importância para o desenvolvimento agrícola, o processo de FBN em *Stylosanthes* ainda é considerado de baixa exploração, pelo o fato dos sistemas de produção que cultivam forrageiras ainda serem baseados na exploração de gramíneas. Também é importante salientar que as informações e disponibilidade de inoculantes para a cultura ainda é restrito, sendo em sua maioria destinado as culturas da soja (*Glycyne max*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

Segundo Paciullo *et al.*,(2003), trabalhando com *Stylosanthes guianensis* em consórcio com *Brachiaria brizantha*, o N fixado além de influenciar no crescimento da gramínea,

contribuiu para o aumento da qualidade da dieta e massa de forragem total da pastagem, aumentando a capacidade de suporte da mesma.

No Estado de Roraima, os trabalhos com estilosantes foram desenvolvidos com objetivos de avaliar a adaptação às condições edafoclimáticas locais, produtividade de sementes e adaptação aos diversos sistemas de produção agrícola e pecuária (GIANLUPPI *et al.*, 2002). Os trabalhos com *Stylosanthes capitata* cultivar lavradeiro, lançado pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), em 1983, recomendado para os cerrados da Colômbia, foi introduzido em Roraima no mesmo ano pela EMBRAPA.

Essa cultivar apresenta excelente adaptação, tanto em plantio direto quanto em plantio convencional, boa tolerância a pragas e doenças, à seca e ao fogo, produzindo grande quantidade de sementes de fácil colheita mecanizada, excelente taxa de ressemeadura e persistência na pastagem, consorcia bem com gramíneas forrageiras, com culturas produtoras de grãos (milho, arroz, sorgo) e com capim nativo, boa produção de matéria seca, grande resistência ao pastejo e pisoteio, rápida rebrota no segundo ano, podendo ser usado em pastagens consorciadas, bancos de proteína no período chuvoso e como cultura de cobertura e melhoria de solos nos sistemas de produção de grãos. (GIANLUPPI *et al.*, 2002).

No estudo de avaliação agronômica dessa cultivar, segundo Gianluppi *et al.*, (2002) não há necessidade de inocular as sementes de *Stylosanthes* com bactérias do grupo rizóbio e nem a aplicação de adubos nitrogenados, pois o *Stylosanthes* nodula com estirpes, que ocorrem naturalmente nos solos de cerrados de Roraima. Entretanto, estes estudos foram pontuais, tornando-se necessária uma avaliação mais adequada da resposta de inoculantes rizobianos nos estilosantes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica no processo de fixação biológica de nitrogênio de bactérias isoladas de estilosantes (*Stylosanthes* ssp.) nativos e cultivados.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar rizóbios a partir de nódulos de estilosantes nativos e cultivados em Roraima;
- Identificar as espécies de *Stylosanthes* em simbiose com os rizóbios;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados obtidos de *Stylosanthes*;
- Avaliar a eficiência simbiótica dos rizóbios, utilizando *Stylosanthes capitata* cv. lavradeiro como simbionte.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e identificação de diferentes espécies de estilosantes no Cerrado de Roraima

As coletas foram realizadas no Campo Experimental Água Boa - Embrapa Roraima, localizado no Município de Boa Vista e também em áreas particulares no Município de Bonfim (Tabela 1).

Tabela 1. Locais de coleta de plantas de estilosantes (*Stylosanthes* spp.) no Cerrado de Roraima.

Data	Ponto	Município/ Local	Descrição	Localização
01/08/2012	P1	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	Área de integração lavoura pecuária floresta	N 02°39'49.8" W60°50'55.8"
01/08/2012	P2	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	Área de pastagem plantada	N 02°39'53.0" W60°50'37.1"
01/08/2012	P3	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	Capim nativo	N 02° 40' 10.7" W 60°50'55.8"
10/08/2012	P4	Bonfim/ Área Particular	Estrada próxima a lavoura de soja	N 03°17'20.5" W60°20'45.6"
10/08/2012	P5	Bonfim/ Área Particular	Estrada próxima a lavoura de soja	N 03°17'32.8" W60°21'26.7"
10/08/2012	P6	Bonfim/ Área Particular	Área de cultivo de arroz em pousio	N 03°16'03.8" W60°16'18.5"

Fonte: Josimar Chaves e Krisle da Silva

Foram coletadas amostras das raízes com auxílio de pá reta, a uma profundidade de 30 cm e distante 20 cm do coleto das plantas. Estas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos contendo papel úmido e levadas ao laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima, onde foram lavadas para observação de nodulação. A parte aérea das plantas contendo flores foi coletada para confecção de exsicatas. Estas foram então depositadas no Herbário do Museu Integrado de Roraima (MIRR) para a identificação botânica de acordo com Harris e Harris, (1994), as suas características botânicas estão descritas no **Apêndice 8.9**. Amostras de solo foram coletadas das áreas onde foram encontradas as plantas de estilosantes e enviadas ao laboratório de solos da Embrapa para análise química e granulométrica, segundo Embrapa, (1997).

4.2. Isolamento e purificação das bactérias de nódulos de Estilosantes

Para o isolamento das bactérias, as raízes das plantas de estilosantes recém coletadas e contendo nódulos foram lavadas para retirar o excesso de solo, em seguida foi realizada a retirada dos seus nódulos. Posteriormente, procedeu-se a desinfestação superficial dentro de câmara de fluxo laminar, sendo os nódulos imersos em álcool 96% por 30 segundos, imersão em hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos e 10 lavagens sucessivas em água estéril.

Os 564 nódulos desinfestados foram individualmente macerados com pinça estéril e o líquido intra-nodular foi estriado utilizando alça de platina em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (FRED e WAKSMAN, 1928) com 10 mL / L⁻¹ de indicador vermelho congo a 0.25%, as placas foram incubadas a 28 °C no escuro. Avaliou-se o surgimento de colônias até 10 dias. Nas placas de Petri, onde se verificou o surgimento de colônias, as mesmas foram repicadas para outra placa de Petri contendo meio de cultura 79 com indicador azul de bromotimol (0,5%) e novamente incubadas para a purificação dos isolados. As placas foram monitoradas diariamente visando verificar o surgimento de colônias isoladas para posterior caracterização morfológica e cultural.

4.3. Caracterização morfológica cultural

A avaliação das características morfológicas foram realizadas mediante cultivo dos isolados em meio de cultura sólido YMA contendo azul de bromotimol e incubadas a 28°C. A caracterização foi iniciada a partir do aparecimento de no mínimo três colônias isoladas. A caracterização cultural foi realizada por meio da avaliação das características: alteração do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro); taxa de crescimento medida pelo tempo de surgimento de colônias isoladas (muito rápido – até 1 dia, rápido - 2 a 3 dias, intermediário - 4 a 5 dias, lento - 6 a 10 dias, muito lento >10 dias); diâmetro das colônias (mm); forma das colônias (puntiforme, circular ou irregular); elevação das colônias (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante); borda das colônias (inteira ou irregular); superfície das colônias (lisa ou rugosa); produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante); transparência das colônias (opaca, transparente e translúcida); cor das colônias (branca, amarela e creme); elasticidade do muco (sim ou não); aparência do muco (homogêneo ou heterogêneo) e consistência do muco (aquosa, seca, viscosa, gomosa e butirica). O parâmetro consistência foi observado através do auxílio da alça de platina, onde se fez leves toques em cima das colônias crescidas, a consistência seca foi quando a alça não conseguia retirar a colônia do meio de cultura ou retirou-se pouco, a aquosa foi quando o muco escorreu pela placa ao ser

inclinada, a gomosa foi quando a alça conseguiu retirar uma parte da colônia de maneira que ela aderisse sem escorrer, se a alça tocasse na colônia e ao retirar formasse um fio contínuo, então seria uma consistência viscosa, e se possuísse um aspecto de manteiga seria butírica. O detalhe óptico foi o opaco, quando não possuiu brilho, translúcido quando permitiu a passagem da luz através da placa e transparente quando além de permitir a passagem da luz foi possível observar claramente o que se tinha do outro lado.

Para as características morfológicas culturais foram atribuídas valores entre 0 e 1, indicando ausência ou presença da característica, respectivamente. As características foram comparadas e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jaccard (S_j) em que $S_j = a/a + b + c$. Nesta equação, **a** é a presença das características ambas as bactérias, **b** presença em uma bactéria e ausência em outra, e **c** é a ausência em uma bactéria e presença em outra. Todas as características tiveram o mesmo valor. As bactérias e estirpes referência foram agrupadas pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representadas graficamente por um dendrograma (NTSY – pc. versão 2.1t) (**Apêndice 1**).

4.4. Autenticação dos isolados em feijão-caupi

Oitenta e nove isolados foram selecionados para autenticação em feijão-caupi. Estes foram selecionados através da similaridade dos grupos bacterianos. O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente a Embrapa Roraima por 20 dias, com o objetivo de avaliar a capacidade nodulífera destes isolados na planta hospedeira feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

Utilizou-se o feijão-caupi, cultivar BRS Guariba como hospedeiro, por ser uma cultura de ciclo curto e possuir capacidade de nodular com várias espécies de bactérias (ZILLI *et al.*, 2009).

Para a autenticação das bactérias utilizou-se garrafas do tipo “long neck” (350 mL), contendo solução nutritiva estéril de Hoagland e Arnon (1950) modificada. (**Anexo 1**).

No controle sem inoculação e com nitrogênio, utilizou-se a solução de Hoagland e Arnon completa, com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio.

Em cada garrafa foram colocadas duas tiras de papel de germinação, com 2 cm de largura e comprimento igual à altura da garrafa, as quais serviram de suporte para as raízes, além de promover a subida da solução nutritiva por capilaridade. Posteriormente, todas as garrafas foram autoclavadas por 20 minutos, à pressão de 1.5 kg / cm^{-2} , a $127 \text{ }^\circ\text{C}$.

As sementes de feijão-caupi, cultivar BRS Guariba, foram submetidas a um processo de desinfestação superficial com álcool 96% (30 segundos), peróxido de hidrogênio 5% (5 minutos), 10 lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Para a germinação das sementes, estas foram colocadas em placas de Petri contendo algodão e papel de germinação umedecido como suporte, previamente esterilizadas, e colocadas por 48 horas, em câmara de crescimento, a 28 °C.

O experimento foi constituído com 92 tratamentos com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, sendo 89 com inoculações das estirpes isoladas de nódulos de estilosantes, 1 controle positivo com inoculação da estirpe referência BR 3262, recomendadas como inoculante para feijão-caupi pelo Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral). Os 89 isolados bacterianos selecionados e o controle positivo (BR 3262) foram crescidos em meio 79 líquido, aos quais se adicionou uma alçada de células bacteriana e incubadas a temperatura ambiente sob agitação de 150 rpm em agitador tipo Shaker, por 4 dias. Em cada tratamento inoculado foi adicionado 1 mL do inoculante sobre a base da planta.

Para avaliação da nodulação, ao final dos 20 dias, as plantas foram coletadas para verificação da ausência ou presença de nódulos.

4.5. Eficiência simbiótica em *Stylosanthes capitata* cv. Lavradeiro.

Baseado nos isolados que apresentaram nodulação em feijão-caupi, realizou-se um experimento conduzido em casa de vegetação, na Embrapa Roraima, por 65 dias, com o objetivo de avaliar a eficiência simbiótica dos isolados.

O cultivo do *Stylosanthes capitata* cv. Lavradeiro foi realizado em vasos plásticos (capacidade de 2,41 dm³), contendo solo autoclavado duas vezes á pressão de 1,5 kg / cm⁻², a 127 °C, por 20 minutos. Os vasos foram preenchidos com solo e areia estéril na proporção de 1:1, coletado na camada de 0 – 20 cm, no Campo Experimental Água Boa da Embrapa Roraima. As características físicas e químicas do solo antes e após autoclavagem estão na **Tabela 2.**

Tabela 2. Composição química e física das amostras de solo antes e após autoclavagens a pressão de 1,5 kg / cm², a 127 °C, por 20 minutos.

Solo natural																
pH	P	K	Ca	Mg	Al	V	M.O	Zn	B	Fe	Mn	S	Cu	Areia	Silte	Argila
H ₂ O	... mg dm ⁻³ cmol _c dm ⁻³ ...				%	g kg ⁻¹ mg dm ⁻³ g kg ⁻¹			
5,5	3,20	0,04	1,0	0,34	0,01	48,0	12,05	-	-	-	-	-	-	795,1	56,6	148,3
Solo Autoclavado e Adubado																
6,5	21,28	18	1,2	0,30	0,10	56,43	11,8	2,61	0,21	42,06	2,79	18,26	0,39	-	-	-

Fontes: Laboratório de Análise de Solo e Plantas – Embrapa Roraima e Laboratório de Análises de Solo – Universidade Federal de Lavras

Foram utilizados os tratamentos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral) e com inoculação da estirpe recomendada como inoculante para *Stylosanthes*, BR-446 (*Bradyrhizobium* sp.), como controle e os isolados de estilosantes que nodularam em feijão-caupi no experimento de autenticação, totalizando 188 parcelas experimentais.

No controle sem inoculação e com nitrogênio, utilizou-se solução de Nitrato de Amônia (NH_4NO_3), equivalente à adubação de $30 \text{ kg} / \text{ha}^{-1}$ de N, fornecido uma vez por semana (SYLVESTER-BRADLEY *et al.*, 1983). Em cada vaso com solo estéril foi realizada adubação fosfatada e potássica equivalente a $60 \text{ kg} / \text{ha}^{-1}$ de P_2O_5 e K_2O (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2007), na fórmula de Superfosfato Simples e Cloreto de Potássio.

A quebra da dormência das sementes foi realizada por escarificação utilizando lixa d'água nº180. A desinfestação das sementes foi realizada conforme mencionado anteriormente.

Os isolados selecionados e o controle positivo (BR 446) foram repicados em placas de Petri, contendo meio YMA + azul de bromotimol e colocados em câmara de crescimento a 28°C por 4 dias. Para o preparo do inóculo, 1 mL de água esterilizada foi aplicado sobre a cultura crescida de cada isolado em placa com meio sólido, seguindo-se de uma raspagem e coleta de 1mL de suspensão a qual foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado e adicionando mais 9 mL de água esterilizada. Em seguida homogeneizou-se a solução e aplicou-se 0,5mL do inóculo na base de cada planta.

As plantas foram irrigadas com água esterilizada (50mL / vaso) para manter uma capacidade de campo de 75%.

Para avaliar a eficiência simbiótica dos isolados, ao final dos 65 dias após semeadura, as plantas foram coletadas para determinar o número de nódulos (NN), a matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total da parte aérea.

As plantas foram coletadas e sua parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e levados para estufa de circulação forçada (65°C) até atingir massa constante, para a determinação da matéria seca da parte aérea e triturada em moinho tipo Willey para determinação do nitrogênio total de acordo com o método Kjeldahl (1883). Os nódulos, após a lavagem das raízes foram destacados e colocados para secagem em estufa de circulação forçada (65°C) para determinação do número e massa seca de nódulos.

As variáveis NN, MSN, MSPA e N total foram transformados a raiz quadrada, seguindo os pressupostos de normalidade e homogeneidade. Os dados foram submetidos à

análise de variância por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização morfológica cultural

5.1.1. Isolamento das bactérias

Foram isolados 504 nódulos de seis áreas dos municípios de Boa Vista e Bonfim. Destes nódulos foram isoladas 258 bactérias, sendo que 152 foram oriundos do município de Boa Vista, de áreas de integração lavoura pecuária floresta (P1), pastagem cultivada (P2) e de capim nativo (P3). Enquanto que 106 bactérias do município de Bonfim são de áreas próximas de lavoura de soja (P4 e P5) e arroz (P6) (**Figura 1**).

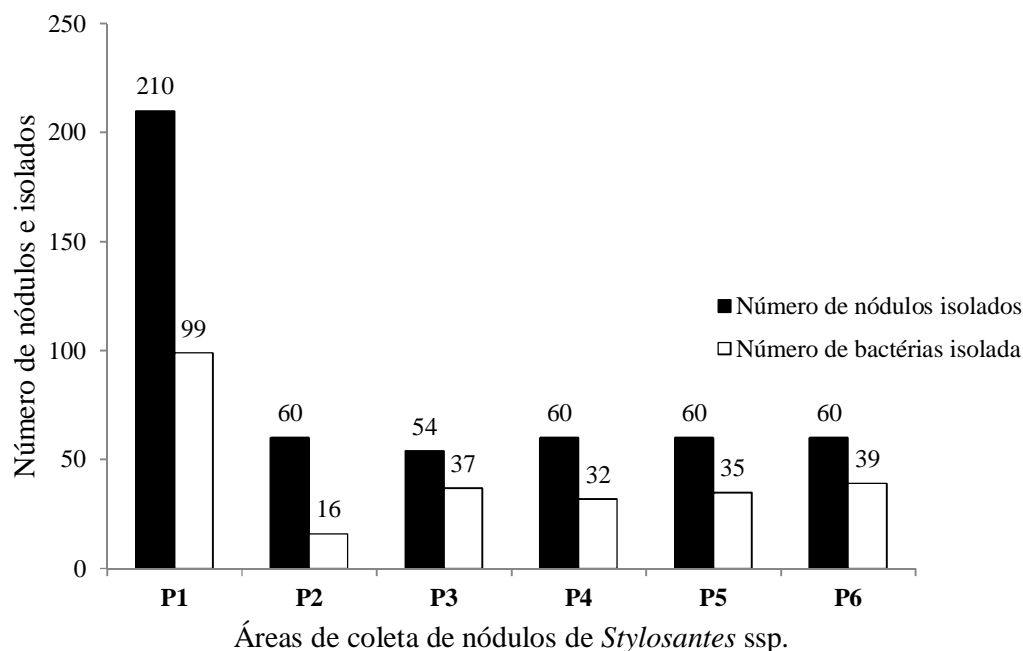


Figura 1. Distribuição quantitativa de nódulos e isolados bacterianos obtidos de *Stylosanthes* ssp. coletados em dois municípios do Estado de Roraima.

Foi possível o isolamento em 50% dos nódulos coletados, havendo uma tendência de obtenção de maior número de nódulos nas áreas P4, P5 e P6, cuja análise de solo havia revelado baixa acidez e bons teores de fósforo, provavelmente refletindo o histórico de cultivo destas áreas com soja e arroz e onde as plantas apresentavam maior vigor (**Tabela 3**). Como as plantas foram coletadas diretamente no campo é possível que o maior vigor das plantas

tenha influenciado no desenvolvimento dos nódulos e conseqüentemente na obtenção de maior número de bactérias.

Tabela 3. Análise química e granulométrica das amostras de solo dos diferentes pontos de coleta de plantas de Estilosantes no Cerrado de Roraima.

Local	Características Químicas						Características Físicas			
	pH	Ca	Mg	Al	K	P	M.O	Argila	Silte	Areia
	H ₂ O cmol _c dm ⁻³ mg dm ⁻³ ..				% g kg ⁻¹		
P1	5,4	0,32	0,10	0,25	0,03	4,42	1,08	173	17	810
P2	4,8	0,26	0,16	0,40	0,03	3,13	-	-	-	-
P3	4,1	0,30	0,20	0,80	0,01	3,00	1,10	200	40	760
P4	6,8	0,81	0,24	0,01	0,14	11,54	2,61	124	68	808
P5	5,0	0,39	0,12	0,24	0,04	15,02	4,96	109	148	743
P6	5,4	0,24	0,07	0,17	0,10	22,84	9,72	111	127	762

Fonte: Laboratório de Análise de Solo e Plantas – Embrapa Roraima

Adicionalmente também foram avaliados 44 isolados de rizóbios que haviam sido coletados a partir de nódulos de *Stylosanthes* ssp. Trinta e três destes isolados foram obtidos de uma espécie não identificada de estilosantes e onze havia sido obtidos a partir de amostras de solo usando como planta isca *Stylosanthes capitata* cv. lavradeiro e encontravam-se depositados na coleção de cultura da Embrapa Roraima.

5.1.2. Caracterização morfológica cultural

A partir da caracterização fenotípica dos isolados e das estirpes-referência foi gerado um dendrograma onde foi possível verificar a formação de 87 grupos com 70% de similaridade entre si (**Apêndice 1**), demonstrando elevada diversidade morfológica entre os isolados. As duas estirpes usadas como padrão, SEMIA 5080 indicada para cultura da soja e a BR 446 recomendada para *Stylosanthes*; as duas do gênero *Bradyrhizobium*, formaram grupos independentes, sendo que apenas o isolado St134 F47 agrupou-se com a BR 446.

Quanto à caracterização fenotípica dos 303 isolados de *Stylosanthes*, através da morfologia cultural das colônias verificou-se que 33% das bactérias apresentaram crescimento muito rápido, 46 % rápido, 20,3% intermediário e 0,7% lenta (**Figura 2**). Quanto à alteração do pH do meio, 36 % apresentaram reação ácida, 60 % neutra e 4% alcalina em meio YMA acrescido de azul de bromotimol (**Figura 3**).

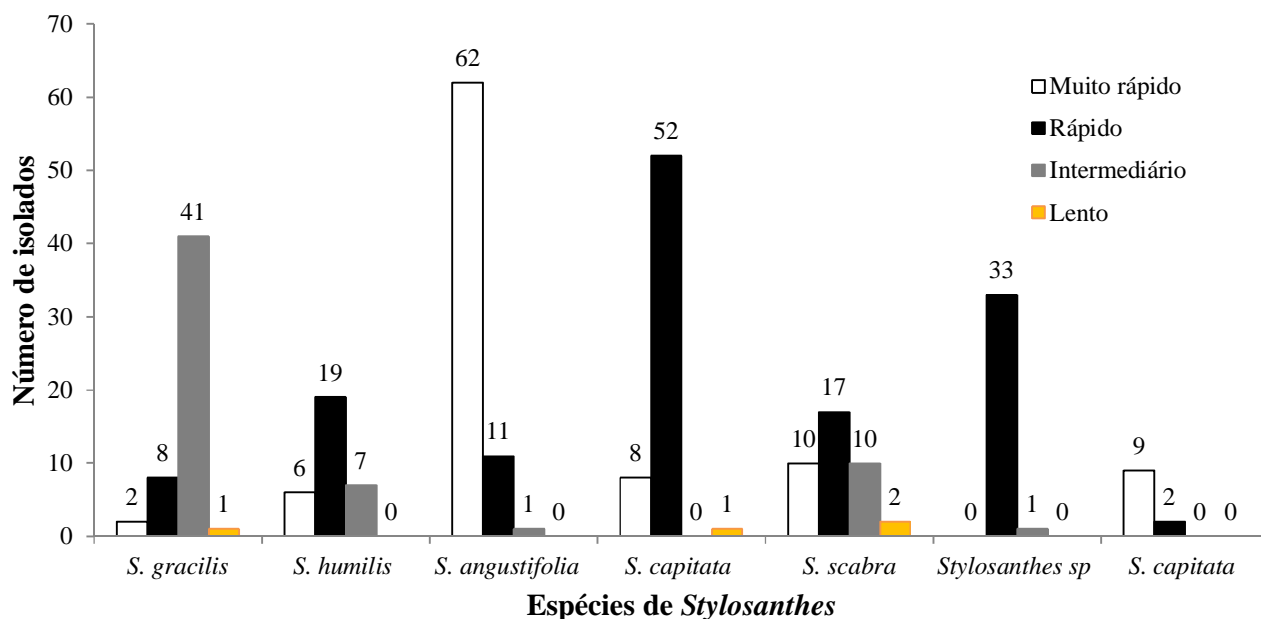


Figura 2. Tempo de crescimento dos isolados obtidos de espécies de estilósantes do Cerrado de Roraima. Muito rápido até 1 dia; rápido 2-3 dias; intermediário 4-5 dias; lento 6-10 dias.

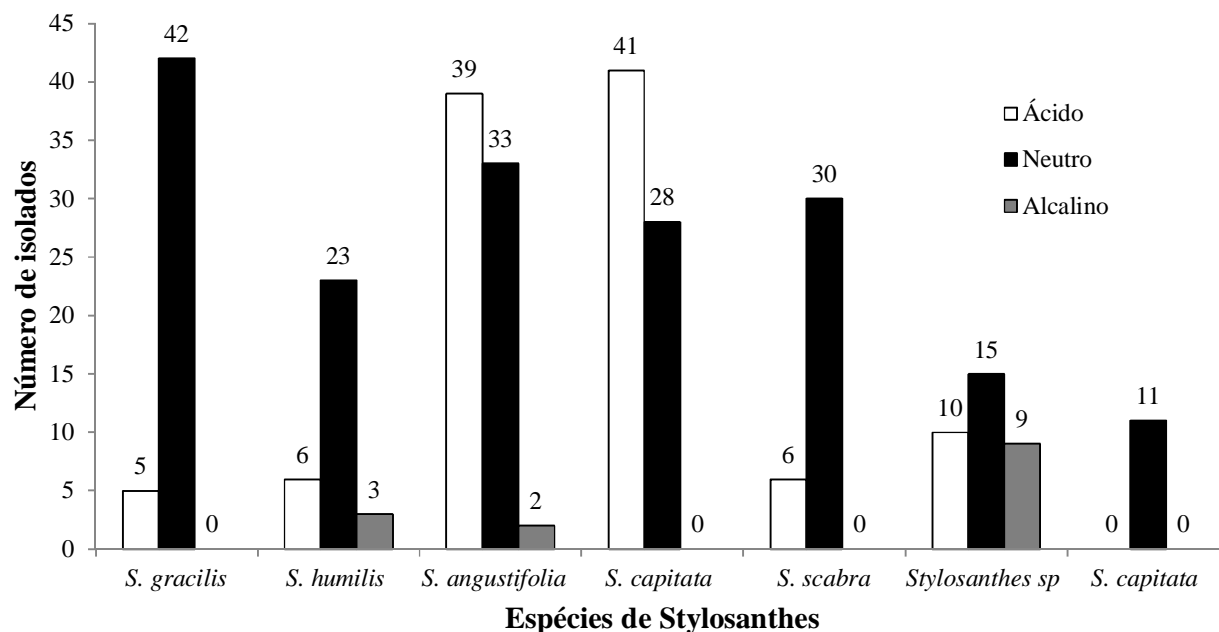


Figura 3. Reação de alteração do pH em meio YMA contendo azul de bromotimol dos isolados de espécies de estilósantes coletadas no Cerrado de Roraima.

Segundo Zakhia e Lajudie (2001), as bactérias da ordem *Rhizobiales* podem ser divididas em função da velocidade de crescimento em meio de cultura, a reação ácida ou básica e o diâmetro de colônia, podendo dividir os gêneros em três grupos: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*, com crescimento rápido e tempo de crescimento de 1 – 3 dias e reação ácida; *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*, de crescimento intermediário e tempo de crescimento 4-5 dias e reação ácida ou alcalina; e *Bradyrhizobium* com crescimento lento e habilidade de alcalinizar o meio de cultura (SANTOS *et al.*, 2007) e coloração branca das colônias e do muco (SILVA *et al.*, 2012).

Neste trabalho, dos 303 isolados de nódulos de *Stylosanthes* ssp., cerca de 79% formaram colônias em até 3 dias, o que caracteriza estirpes de crescimento muito rápido e rápido, características estas inerente ao gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* (ZAKHIA e LAJUDIE, 2001) e vários outros gêneros como *Aminobacter* (ARDLEY *et al.*, 2012; MAYNAUD *et al.*, 2012). Esta predominância de isolados de crescimento muito rápido e rápido contrasta com o conhecimento corrente de que os rizóbios que nodulam *Stylosanthes* pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* que por sua vez compreende, geralmente, estirpes de crescimento intermediário e lento e são capazes de alcalinizar o meio de cultura (THIES *et al.*, 1991; BARBERI *et al.*, 1998; ZAKHIA e LAJUDIE, 2001; SANTOS *et al.*, 2007). Somente 21% dos isolados tiveram crescimento intermediário e lento e só 4% alcalinizaram o meio de cultura.

O pH é um dos atributos edáficos que limita a presença de microrganismos no solo (BROCKWELL *et al.*, 1991). Figueiredo *et al.*, (1996) verificaram que a ocorrência de rizóbio de crescimento rápido ou lento está relacionado com o pH do solo. Giongo *et al.*, (2007), verificaram ao avaliar os fatores ambientais do solo que afetavam a diversidade de populações de *Bradyrhizobium* spp., isolados de nódulos de soja, que o pH do solo foi a principal característica que afetou a diversidade das populações, e que menor diversidade foi encontrada nos solos com pH mais ácido. Essa característica relaciona aos resultados obtidos neste trabalho em que os isolados que apresentaram reação ácida (**Figura 3**), foram isoladas de áreas com pH variando de 5,0 a 5,4 (**Tabela 3**) da espécie *Stylosanthes angustifolia* Vogel, planta indicadora de solos de baixa fertilidade.

Isolados com pouca a moderada produção de muco foram na maioria os que apresentaram reação neutra no meio YMA com azul de bromotimol (**Apêndice 2**). Estas são características típicas encontradas em bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. No

entanto, as com abundante produção de muco, apresentaram em sua maioria reação ácida que são características que assemelha as do gênero *Rhizobium* (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Analisando juntamente as espécies de estilosantes identificadas botanicamente (*Stylosanthes capitata* Vogel, *Stylosanthes scabra* Vogel, *Stylosanthes humilis* Kunth, *Stylosanthes angustifolia* Vogel e *Stylosanthes gracilis* Kunth) com as características culturais, tempo de crescimento e alteração do pH do meio, dos 303 isolados obtidos, observou-se que a maioria dos isolados da espécie *Stylosanthes gracilis* Kunth apresentaram crescimento intermediário (41) e reação neutra (42); os isolados da espécie *Stylosanthes humilis* Kunth, na sua maioria apresentaram crescimento rápido (19) e reação neutra (23), correlacionando com os isolados da espécie *Stylosanthes scabra* Vogel, que em sua maioria apresentaram crescimento rápido (17) e reação neutra (30) e *Stylosanthes capitata* Vogel, com 54 isolados de crescimento rápido e 41 isolados de reação ácida ao pH do meio. Enquanto que os isolados da espécie *Stylosanthes angustifolia* Vogel, em sua maioria acidificaram o meio de cultivo, 39 isolados, e tempo de crescimento, muito rápido, 62 isolados.

5.2. Autenticação por meio da inoculação em feijão-caupi

Quarenta e quatro isolados estabeleceram simbiose com feijão-caupi. Na **Tabela 4**, encontram-se as características culturais dos 44 isolados que apresentaram nodulação em feijão-caupi. Do total de isolados com capacidade de estabelecer simbiose com feijão-caupi, 34% apresentaram crescimento muito rápido, 45% crescimento rápido, 12% crescimento intermediário e 8% crescimento lento. Em relação ao pH do meio, cerca de 30% acidificaram o meio (RA), 61% não alteraram o pH do meio (RN) e 9% alcalinizaram o meio (RALC). Isolados com crescimento intermediário ou lento e que alcalinizam o meio de cultura, são características do gênero *Bradyrhizobium* (THIES *et al.*, 1991; BARBERI *et al.*, 1998; ZAKHIA e LAJUDIE, 2001; SANTOS *et al.*, 2007).

Tabela 4. Principais características culturais dos 44 isolados de *Stylosanthes* ssp. que estabeleceram simbiose com o feijão-caupi.

Isolados	TC	pH	FC	EC	BC	SC	PM	TM	CM	CC	AM	EM
1A39	R	N	C	E	L	L	P	O	G	A	Ho	N
2C18	MR	A	C	E	L	L	M	O	G	A	He	S
4A29	R	A	C	P	L	L	M	TL	G	C	Ho	N
1B21	I	N	C	E	L	L	A	O	G	B	Ho	N
1B61	R	N	C	P	L	L	A	T	G	A	Ho	N
G52	MR	AL	C	P	L	L	P	T	G	B	He	N
1B27	R	N	C	E	L	L	A	O	G	A	Ho	N
6E2-3	R	N	C	P	L	L	P	T	G	B	Ho	N
F45	MR	N	C	P	Lo	L	P	O	G	A	Ho	N
1E52	R	N	C	Co	L	L	A	TL	A	A	He	N
2C9	MR	N	I	E	L	L	M	O	G	A	Ho	N
2E1-5	MR	N	C	P	L	L	M	O	B	A	Ho	N
3D20	I	N	C	E	L	L	M	O	G	B	Ho	N
G30	MR	N	C	E	L	L	A	O	G	C	Ho	N
H41	R	A	C	E	L	L	A	TL	G	A	Ho	N
1B74	I	N	I	E	L	L	A	T	G	B	Ho	N
G57	MR	N	C	E	L	L	A	O	G	C	Ho	N
1B85	L	N	C	P	L	L	P	T	G	C	He	N
1B75	I	N	C	P	L	L	P	T	G	B	Ho	N
4A48	I	AL	C	P	L	L	A	O	G	A	Ho	N
2C22	R	N	C	P	L	L	P	O	G	B	Ho	N
1A40	R	N	C	E	L	L	M	TL	G	A	He	N
1A24	R	AL	C	E	L	L	A	TL	A	C	He	N
G33	MR	A	I	E	L	L	M	TL	G	A	He	N
1A11	R	A	I	P	L	L	M	O	G	A	Ho	N
1A8	R	N	C	P	L	L	M	T	S	B	Ho	N
H36	MR	A	I	E	L	L	A	O	G	A	Ho	N
1B28	R	N	C	E	L	L	P	TL	G	A	He	N
1B33	R	A	C	E	L	L	A	TL	G	A	He	N
1E1-2	MR	N	C	P	L	L	M	T	G	B	Ho	N
1E57	R	A	C	E	L	L	A	TL	G	A	Ho	N
3D16	I	N	I	P	L	L	M	TL	G	B	He	N
1E37	R	A	C	Co	L	L	A	T	G	C	Ho	N
3D5	I	N	C	E	L	L	M	O	G	C	He	N
2E1-2	MR	N	C	P	L	L	M	T	G	C	Ho	N
1B10	R	N	C	P	L	L	P	O	B	A	Ho	N
H5	MR	A	C	P	L	L	A	O	G	A	Ho	N
2C5	R	A	C	P	L	L	P	TL	G	A	He	N
1B13	MR	N	I	E	L	L	M	O	G	B	Ho	N
F29	R	AL	C	P	L	L	P	O	G	B	Ho	N
1E6	R	A	C	Co	L	L	A	TL	A	A	He	S
G54	MR	A	C	E	L	L	A	TL	G	A	Ho	N
G21	MR	N	C	Co	L	L	M	O	G	B	Ho	N
1B20	MR	N	C	E	L	L	A	TL	G	C	He	N

(TC) Tempo de crescimento: (MR) muito rápido, (R) rápido, (I) intermediário, (L) lento, (ML) muito lento; **pH do meio:** (A) ácido, (N) neutro, (AL) alcalino; **(FC) Forma da Colônia:** (P) puntiforme, (C) circular, (I) irregular; **(EC) Elevação da Colônia:** (P) plana, (E) elevada, (Co) Convexa; **(BC) Borda da Colônia:** (L) lisa, (O) ondulada, (Lo) lobada; **(SC) Superfície da Colônia:** (L) lisa, (R) rugosa; **(PM) Produção de Muco:** (E) escassa, (P) pouca, (M) moderada, (A) abundante; **(TM) Transparência do Muco:** (O) opaca, (T) transparente, (TL) translúcido; **(CM): Consistência do Muco:** (A) aquosa, (S) seca, (V) viscosa, (B) butírica; **(CC) Cor da Colônia:** (A) amarela, (C) creme, (B) branca; (AM) **Aparência do Muco:** (Ho) homogênea, (He) heterogênea; **(EM) Elasticidade do Muco:** (S) sim, (N) não.

Combinando-se as espécies de estiloides identificadas botanicamente (*Stylosanthes capitata* Vogel, *Stylosanthes scabra* Vogel, *Stylosanthes humilis* Kunth, *Stylosanthes angustifolia* Vogel e *Stylosanthes gracilis* Kunth) com as características culturais, tempo de crescimento e alteração do pH do meio, entre os 44 isolados que estabeleceram simbiose com feijão-caupi (**Quadro 1**), observou-se que a maioria dos isolados da espécie *Stylosanthes angustifolia* Vogel apresentou crescimento muito rápido (8) e capacidade de acidificar o meio (6); os isolados da espécie *Stylosanthes gracilis* Kunth, na sua maioria apresentaram crescimento rápido (4) e reação neutra (6), correlacionando com os isolados da espécie *Stylosanthes scabra* Vogel, que em sua maioria apresentaram crescimento rápido (5) e reação neutra (10) e *Stylosanthes capitata* Vogel, com 6 isolados de crescimento rápido e 5 isolados de reação ácida ao pH do meio. Enquanto que os isolados da espécie *Stylosanthes humilis* Kunth, em sua maioria não alteraram pH do meio de cultivo (pH neutro) e quanto ao tempo de crescimento, distribuiu-se igualmente entre muito rápido (1) e rápido (1).

Essa diversidade morfológica dos isolados em relação às espécies de *Stylosanthes* poderá comprovar o caráter de especificidade em relação à nodulação, corroborando os resultados encontrados por outros autores (LEWIN *et al.*, 1987; MELLONI *et al.*, 2006; NÓBREGA, 2006; DATE, 2010).

Quadro 1. Características fenotípicas culturais (pH e tempo de crescimento) dos 44 isolados das cinco espécies de *Stylosanthes* ssp. que realizaram simbiose com feijão-caupi.

Espécies de <i>Stylosanthes</i>	pH do meio			Tempo de Crescimento				
	Ácido	Neutro	Alcalino	Muito rápido	Rápido	Intermediário	Lento	Muito lento
<i>S. gracilis</i> Kunth	1	6	0	0	4	3	0	0
<i>S. humilis</i> Kunth	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>S. angustifolia</i> Vogel	6	2	1	8	1	0	0	0
<i>S. capitata</i> Vogel	5	3	0	2	6	0	0	0
<i>S. scabra</i> Vogel	1	10	0	2	5	3	1	0
<i>Stylosanthes</i> sp	1	4	1	3	2	0	1	0

Quarenta e cinco isolados, não estabeleceram simbiose com feijão caupi, tal fato pode estar relacionado à coexistência de bactérias nodulíferas e bactérias endofíticas num mesmo nódulo, que provavelmente cresceram no meio de cultura antes dos rizóbios e acabaram sendo isoladas. Muitos destes isolados endofíticos de nódulos têm sido indicados como promotores de crescimento vegetal ou supressores de patógenos (CHEN *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2009; SAIDI *et al.*, 2011), contribuindo com a produção de hormônios de crescimento vegetal (MALLAIAH, 1997), absorção de nutrientes (RAJENDRAN *et al.*, 2008) e aumento no número de nódulos (RAJENDRAN *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2009).

5.3. Eficiência simbiótica de isolados de *Stylosanthes* ssp.

Os resultados do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total (N) são apresentados na **Tabela 5**. Os controles negativos sem inoculação e sem e com N mineral não apresentaram nodulação, comprovando que não houve contaminação do experimento, o que tornou possível a avaliação da eficiência simbiótica destes isolados.

Em relação a variável número de nódulos (NN) mesmo sem ocorrer diferença estatística, 1 isolado (St1E52) apresentou quantidade superior ao apresentado pelo tratamento com a estirpe recomendada para inoculação de *Stylosanthes* (BR 446) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total em plantas de *Stylosanthes capitata* cv. lavradeiro de 44 isolados, um controle positivo (BR446) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem nitrogênio).

Tratamentos	NN*	MSN*	MSPA*	N*
	 (mg.planta ⁻¹)		
Nitrogenado	0c	0 b	164,91 a	12,61 a
Sem Nitrogênio	0c	0 b	303,83 a	5,52 a
St 2C22	1,7b	0,24 a	223,33 a	6,61 a
St 2C9	1,2b	0,14 a	144,08 a	3,26 a
St 2C18	1,6b	0,20 a	138,96 a	3,93 a
St 1B75	1,9b	0,04 a	150,5 a	3,23 a
St 3D20	2,0b	0,25a	172,17 a	4,45 a
St 4A48	2,8b	0,40 a	151,25 a	4,04 a
St G57	3,7b	0,49 a	451,04 a	9,60 a
St H41	3,4b	1,03 a	230,03 a	4,88 a
St 2E1-5	3,4b	0,71 a	237,75 a	4,85 a
St 1E6	3,8b	0,73 a	172,63 a	4,54 a
St 1A39	4,1b	1,78 a	233,79 a	5,07 a
St G54	4,2b	0,67 a	179,58 a	4,67 a
St 1B61	4,5b	1,77 a	202,69 a	4,45 a
St 1B13	4,6b	1,05 a	261,77 a	4,57 a
St 1A40	4,7b	1,19 a	167,92 a	4,94 a
St 1B85	4,8b	0,82 a	241,49 a	5,32 a
St H5	4,8b	0,78 a	189,33 a	4,63 a
St 1B74	4,9b	1,52 a	283,33 a	6,72 a
St G21	5,0b	0,65 a	150,35 a	3,80 a
St 1A11	5,1b	0,25 a	131,25 a	3,43 a
St F45	5,1b	0,39 a	158,77 a	4,80 a
St 3D5	5,5b	0,87 a	182,86 a	4,09 a
St 2E1-2	5,6b	1,20 a	290,42 a	6,73 a
St 4A29	5,7b	0,85 a	397 a	10,47a
St H36	6,1a	0,34 a	152 a	4,37 a
St G52	6,4a	0,99 a	210,77 a	6,07 a
St 1B10	6,6a	0,87 a	232,83 a	6,21 a
St 3D16	6,7a	0,78 a	212,17 a	5,33 a
St 1E1-2	6,7a	2,09 a	229,23 a	4,08 a
St 1B21	6,8a	0,72 a	203,25 a	5,65 a
St 1A8	6,9a	1,26 a	260 a	7,56 a
St G33	7,2a	4,99 a	274,25 a	6,07 a

St F29	7,3a	1,43 a	343,16 a	7,38 a
St 1A24	7,5a	1,28 a	260 a	6,80 a
St 1E37	8,0a	1,24 a	140,41 a	3,34 a
St 6E2-3	8,1a	1,62 a	319,86 a	7,29 a
St G30	8,6a	1,03 a	174,93 a	4,19 a
St 1B27	8,6a	1,68 a	235,09 a	4,88 a
St 2C5	9,1a	0,87 a	260 a	5,67 a
St 1B28	9,3a	2,61 a	237,78 a	4,45 a
St 1E57	10,8a	1,49 a	308,95 a	5,99 a
St 1B33	11,4a	1,87 a	225,42 a	5,10 a
St 1B20	11,4a	1,76 a	244,92 a	5,27 a
BR 446	13,2a	2,06 a	259,64 a	5,76 a
St 1E52	15,2a	3,87 a	316,17 a	5,99 a
CV (%)	38,96	28,01	30,41	24,23

Valores seguidos da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Dados transformados raiz quadrada de $Y + 1 - \text{SQRT}(Y + 1)$.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Vargas *et al.*, (1994), trabalhando com duas estirpes comerciais e três estirpes selecionadas a partir da população de rizóbio nativa dos Cerrados, em três espécies de *Stylosanthes* (*Stylosanthes capitata* CPAC 706, *Stylosanthes macrocephala* cv. Pioneiro e *Stylosanthes guianensis* 135 cv. Bandeirante), observaram que a inoculação não promoveu nenhum efeito benéfico nas espécies estudadas e mostrou tendência em reduzir a nodulação de *Stylosanthes macrocephala* e *Stylosanthes guianensis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Döbereiner (1970) e Vargas e Suhet (1981).

Mesmo sem diferirem estatisticamente, observa-se um grupo de isolados (St1B20, St1B33, St1E57, St1B28, St2C5 e St1B27) (**Tabela 5**), com média de nodulação superior em relação aos demais isolados. Estes isolados foram obtidos de *Stylosanthes scabra* Vogel e de *Stylosanthes capitata* Vogel coletados de áreas com baixa fertilidade natural (**Tabela 3**) e neutralização do meio, características comum do gênero *Bradyrhizobium* ssp. (ZILLI *et al.*, 2006).

Quanto à massa seca de nódulos (MSN) os isolados não diferiram estatisticamente, porém 3 isolados (StG33, St1E52 e St1B28), foram superiores a estirpe recomendada (BR 446) (**Tabela 5**). Por outro lado, ao avaliar o parâmetro massa seca da parte aérea (MSPA), também foi possível observar que 36 (81%) dos isolados mostraram-se superiores em relação ao tratamento com nitrogênio mineral. Enquanto que, 9 (19%) isolados foram superiores ao inoculado com a estirpe recomendada para *Stylosanthes*. Trabalho desenvolvido por Vargas *et*

al.,(1994), em experimento em campo, em solos do Cerrado, visando avaliar o efeito da inoculação e da adubação nitrogenada sobre a massa seca da parte aérea em *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes bracteata*, verificou que a adubação com 75 kg de N / ha⁻¹ não elevou a produção de MSPA e de N total, indicando maior eficiência das estirpes nativas para essas espécies. Dados semelhantes foram obtidos em trabalhos conduzidos por Sá *et al.*, (1983), em vasos com areia e solução nutritiva, em condições assépticas, com estirpes nativas, isoladas de solos do Cerrado, 35% das estirpes de *Stylosanthes grandifolia* tiveram rendimento de matéria seca igual ou superior ao tratamento com adubação nitrogenada, e 30% das estirpes em *Stylosanthes guianensis*. Esses resultados demonstram a grande variabilidade entre as estirpes isoladas de *Stylosanthes* quanto à eficiência na fixação de N₂ (VARGAS e HUNGRIA, 1997).

Vargas *et al.*, (1994), em trabalhos com *Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes scabra*, verificaram níveis de atividade nitrogenase, de média a alta (1 a 9μ moles de etileno/planta/h), enquanto que em *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* apresentaram pouca nodulação, mais com bom desenvolvimento e sem sintomas visuais de deficiência de N. Vargas e Hungria (1997), comprovaram em ensaios em campo, que a baixa nodulação de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, ocorria devido a sua maior sensibilidade ao nitrogênio mineral do solo. Este efeito inibidor do N do solo na formação de nódulos pode ser também uma explicação para a baixa nodulação que ocorre na maioria das leguminosas forrageiras, após o primeiro ano de estabelecimento. A elevação do teor de N do solo é acentuada pelo acúmulo de resíduos vegetais das leguminosas, além da contínua mineralização do N orgânico (VARGAS e HUNGRIA. 1997).

A análise de variância mostrou efeito significativo dos tratamentos sobre número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e nitrogênio total, porém para a variável matéria seca da parte aérea (MSPA) não houve diferenças significativas entre os 44 isolados que estabeleceram simbiose com *Stylosanthes capitata* cv. Lavradeiro (**Apêndice 3**). Os valores médios encontram-se na **Tabela 5**.

Porém, analisando os valores da matéria seca da parte aérea (MSPA), observa-se que o tratamento nitrogenado foi inferior ao controle sem nitrogênio e sem inoculante. Tal fato é recorrente do período de cultivo, 65 dias, que mesmo as plantas em início de florescimento, não foram suficientes para avaliar a eficiência simbiótica em *Stylosanthes capitata* cv. Lavradeiro, pois é uma planta de crescimento lento. Além disso, possivelmente, a matéria

orgânica, embora em teores baixo, foi suficiente para o desenvolvimento inicial das plantas. A partir do esgotamento da matéria orgânica deveria ocorrer diferenciação entre as estirpes.

Outro fator relacionado à matéria seca da parte aérea (MSPA), mesmo sem ocorrer diferença estatística significativa, os isolados StG57, St4A29, StF29, St6E2-3, St1E52 e St1E57, apresentaram incremento superiores a 45% e 20% em comparação ao tratamento controle sem nitrogênio e sem inoculação e a estirpe padrão, respectivamente. Trinta e cinco isolados (79%) obtiveram valores superior ao do controle nitrogenado. Estes dados demonstram indícios de maior eficiência simbiótica destes isolados com potencial agronômico.

Os teores de nitrogênio total do tecido vegetal analisados foram inferiores ao do controle nitrogenado. Quarenta isolados apresentaram teores de nitrogênio total significativamente igual ao controle nitrogenado, com destaque para os isolados St4A29, StG57, St1A8, StF29 e St6E2-3 (**Tabela 5**).

Analisando a matéria seca da parte aérea (MSPA) juntamente com o nitrogênio total pode-se concluir que os isolados StG57, St4A29, StF29, St6E2-3, apresentaram eficiência simbiótica satisfatória, com ganhos superiores a 30% na produção de massa seca e N em relação ao controle sem inoculação e sem nitrogênio. Estes resultados são superiores aos obtidos por ESCUDER (1982), que demonstrou que a inoculação de uma estirpe eficiente em FBN aumentou em torno de 10% sua produção de massa seca e N.

6. CONCLUSÕES

As áreas de Cerrado do Estado de Roraima apresentam uma grande diversidade de espécies de leguminosas, dentre elas, do gênero *Stylosanthes*;

Existe elevada diversidade fenotípica entre os isolados de rizóbio obtidos;

Há diferenças quanto ao pH e tempo de crescimento dos isolados de rizóbio de acordo com a espécie hospedeira de *Stylosanthes* e das características químicas do solo;

Os isolados obtidos de *Stylosanthes capitata* cv. Lavradeiro possuem maior eficiência simbiótica, quando associado ao seu hospedeiro original comparados as estirpes obtidos de outros hospedeiros, estirpe recomendada e ao controle negativo;

Esses resultados servem de base para novos testes de eficiência simbiótica em outras espécies de *Stylosanthes*. As estirpes St4A29, StG57, St1A8, StF29 e St6E2-3 possuem potencial para serem testadas como inoculante para o *Stylosanthes* em futuras pesquisas.

7. REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, P.B.; BUFARAH, G. **Plantas Forrageiras: Gramíneas e Leguminosas**. São Paulo: Nobel. 1999. 162p.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM. **Temas em evidências**. Lavras: UFLA. 2000. p.273-309.
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P. ; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência Simbiótica de Isolados de Rizóbio Noduladores de Feijão-Fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.35; p.751-757. 2011.
- ARAÚJO, A.S.F.; CARVALHO, E.M.S. **Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas**. UFPI. Comunicado Técnico. n.11. p.1-4. 2006.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B.; CAMPOS, P.R.S.S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**. v.57. p.61-76. 2008.
- ARDLEY, J.K.; PARKER, M.A; DE MEYER, S.E.; TRENGOVE, R.D.; O'HARA, G.W.; REEVE, W. G. *Microvirga lupini* sp. nov.. *Microvirga lotononidis* sp. nov.. and *Microvirga zambiensis* sp. nov are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V.62: 2579–2588. 2012.
- BARBERI, A. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. 2007. 132 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- BARCELLOS, A. de O. **Sistemas extensivos e semi-extensivos de produção de pecuária bovina de corte nos Cerrados**. In Simpósio sobre os Cerrados; International Symposium on Tropical Savanas. Planaltina: EMBRAPA -CPAC. p.130-136. 1996.
- BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRATSUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P.; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40. n.9. p.899-909. 2005.
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; SIMON, M.F.; JÚNIOR, F.D. DOS R.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOURENÇO, M.F.; FARIA, S.M.; SPRENT, J.I.; JAMES,

- E.K.; YOUNG, J.P.W. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**. v.19. n.1. p.44-52. 2009.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63. n. 7. p. 2647-2653. 1997.
- BRANDÃO, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Swartz no Brasil**. Epamig. Minas Gerais. 107p. 1979.
- BRANDÃO, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Swartz no Estado de Minas Gerais**. Epamig. 52p. 1982.
- BROCKWELL, J.; PILKA, A.; Y HOLLIDAY, R. A. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**.v.31: 211–219.1991.
- CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. Re-establishment of *Stylosanthes gracilis* (Leguminosae) at species level. **Kew Bulletin**. v. 65. p.233–240. 2010a.
- CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. *Stylosanthes* (Leguminosae. Dalbergieae) of Venezuela. **Willdenowia**. v.40. 305-329. 2010b.
- CAVALCANTE, C.O.; BARBOSA, R. I.; FLORES, A. S. Leguminosas (FABACEAE) Herbáceas: Grades de savana do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) - RORAIMA. BRASIL; 2009.
- CASSINI, S.T.A.; FRANCO, M.C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia. fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr.,T.J.; BORÉM, AL.(Ed.). **Feijão**. 2.ed. atual. Viçosa. MG; EFV. 2006. p.143-170.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá. v. 32. n. 1. p. 161-169. 2010.
- COSTA, N. M. S. **Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw.** Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 2006. 470p.
- COSTA, A. **Uso de Marcadores Rapd e do Sistema de Informação Geográfica no Estudo da Variabilidade Genética e Ecológica de *Stylosanthes macrocephala* M.B.** Tese de dissertação de Mestrado. UCB - Universidade Católica de Brasília. Mestrado e doutorado em

- Ciência Genômica e Biotecnologia. Brasília. 2004. Disponível em <http://bdtd.ucb.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=143>. Acesso em 29/01/2014.
- COSTA, L.C. da. **O gênero *Stylosanthes* sw. (leguminosae - papilionoideae - Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul.** Tese de dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. UFMS. Campo Grande-MS. 2007.
- COSTA, L.C.DA; SARTORI, A.L.B.; POTT, A. Estudo Taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul. Brasil. **Rodriguésia**; v.59, p.547-572. 2008.
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSAN, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biol Control**, v.5, p. 83–91. 1995.
- DATE, R.A. *Bradyrhizobium* effectiveness response in *Stylosanthes hamate* and *S. seabrana*. **Tropical Grasslands**. v.44, p.141-157. 2010.
- DATE, R.A. *Rhizobium* for *Stylosanthes*. In: STACE. H.E.; EDYE. L.A.. eds. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. 1.ed. Orlando: Florida. 1984. p.243-256.
- DATE, R.A.; BURT, R.L.; WILLIAMS, W.T. Affinities between various *stylosanthes* species as shown by rhizobial. soil pH and geographic relationships. **Agro-Ecosystems**. v.5, p.57-67. 1979.
- DATE, R.A.; EAGLES, D.A. *Bradyrhizobium* strain effectiveness for *Stylosanthes macrocephala*. **Tropical Grasslands**. v.44, p.158–164. 2010.
- DATE, R.A.; NORRIS, D.O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.30, p.85-104. 1979.
- DIAS-FILHO, M.B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação.** 4.ed.rev. atual. e ampl. Belém: Ed. do Autor. 2011. 216p.
- DIAS-FILHO, M.B.; ANDRADE, C.M.S. de. **Pastagens no ecossistema do trópico úmido.** In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: alternativas viáveis visando a sustentabilidade dos ecossistemas de produção de ruminantes nos diferentes ecossistemas. 2005. Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBZ. p.95-104.
- DÖBEREINER, J. Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais. In: SEMINÁRIO SOBRE METODOLOGIA E PLANEJAMENTO DE PESQUISA COM LEGUMINOSAS TROPICAIS. Rio de Janeiro. IPEACS. 1970. **Anais...** Rio de Janeiro: IPEACS. 1970. p.181-192.

- DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M. L. C.; SOUSA JUNIOR, C. L. Fontes e idade de explante. radiação luminosa e combinações de NAA e BAP na indução de calos em *Stylosanthes scabra* Vogel. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.26. p.1901-1909. 1991.
- DUBEUX, J.C.B.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; CUNHA, M.V. 2006. Fluxo de nutrientes em ecossistemas de pastagens: impactos no ambiente e na produtividade. Em: Simpósio sobre manejo da pastagem. **Anais**. FEALQ. Piracicaba-SP. p. 439-505. 2006.
- DUBS, B. **Prodomus Florae Matogrossensis**. Betrona Verlag. Küsnacht. 444p. 1998.
- EDYE, L.A.; MAASS, B. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. I. The biogeography of *Stylosanthes hamate*, *S. scabra* and "*Stylosanthes seabrana*". **Tropical Grasslands**. v.31. p.417-423. 1997.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solos. 2ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997.212p.
- EMBRAPA GADO DE CORTE. Cultivo e uso do estilosantes campo grande. Campo Grande. MS: **Embrapa Gado de Corte**. 2007. 11p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico. 105).
- FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M. Occurrence of Nodulation in legumes. **New Phytologist**. v.111. p.607-619. 2001.
- FERNANDES, C.D. **Resistência de Progênies de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* à antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides***. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrônômica. Botucatu-SP. Tese (Doutorado) 91p. 2003.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis SYSTEM. **Ciência Agrotecnologia** - UFLA. v.35. n.6. p.1039 – 1042. 2011.
- FERREIRA, E.M.; CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. **Soil Biology & Biochemistry**. v.27; p.177-1183. 1995.
- FERREIRA, M.B.; COSTA, N.M.S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG. 1979. 107p.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 20. n. 1. p. 49-54. 1996.

- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**. São Paulo. v.20. n.1. p.68-74. 1994.
- FRANCO, M. C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C. & TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37; p.1145-1150. 2002.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. McGraw-Hill Book Co.,New York. 145 p, 1928.
- FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. O.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. da S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40. n.9. p.1856-1861. 2011.
- GALLOWAY, J.N.; ABER, J.D.; ERISMAN, J.W.; SEITZINGER, S.P.; HOWARTH, R.W.; COWLING, E.B.; COSBY, B.J. The nitrogen cascade. **Bio Science**. v.53. p.341-356. 2003.
- GATES, C. T.; WILSON, J. R. The interaction of nitrogen and phosphorus on the growth, nutrient status and nodulation of *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Townsville Stylo). **Plant and Soil**. v.41. p.325-333. 1974.
- GIANLUPPI, V.; SMIDERLE, O. J.; GIANLUPPI, D. **Utilização e cultivo do estilosantes lavradeiro nas áreas de cerrado de Roraima**. Embrapa Roraima. 2002. 9p. (Circular Técnica. 02).
- GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J.; SÁ, E.L.S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biol Fert Soils**. v.43, p.593-598. 2007.
- GONZALES, L. M.; LOPEZ, R. C.; FONSECA, I.; RAMÍREZ, R. 2000. Growth stomatal frequency, DM yield and accumulation of ions in nine species of grassland legumes grown under salty conditions. **Pastos y Forrajes**. v. 4. p.299-308.
- GONELA, A.; LEMOS, E.G. M.; RODRIGUES, T. de J. D.; PATERMIANI, M. L. S. Reações enzimáticas ao estresse salino durante a germinação de *Stylosanthes*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 39. p.93-95. 2004.
- GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P.M.D.; NÓBREGA, R.S.. A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Appl Environ Microbiol**. v.78, p.6726-6733. 2012.

- GOUDAO, L.; PHAIKAEW, C.; STUR, W.W. Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilization in China and south-east Asia. **Tropical Grasslands**. v.31, p.460-467. 1997.
- GROF, B.; SHULTZE-KRAFT, R.; MULLER, F. *Stylosathes capitata* Vog.. some agronomic attributes and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) **Tropical Grassland**. v.13. p.28-37. 1979.
- HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizobios oriundos de solos ácidos de Iranduba - Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40; p.667-672. 2005.
- HARRIS, J. G.; HARRIS, M. W. **Plant identification terminology: an illustrated glossary**. Spring Lake. 198p. 1994.
- HOAGLAND, D. ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Califórnia Agriculture Experiment Station. 1950. (Circular. nº.347).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de Fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja. 2007. 48p. (Embrapa Soja. Documentos. 283).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja. 2001. 48p. (Embrapa Soja. Circular Técnica. 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica. 13).
- IBÁÑEZ, F. *et al.* Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**. v.32. p.49-55. 2009.
- JACCARD, P. Étude comparative de La distribution florale dans une portion dès Alpes et dès Jura. **Bulletin de La Socité Voudoise dès Sciencies Natureller**. n.37, p.547 – 579, 1901.
- JARAMILLO, P. M. D. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**. 2010. 66p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras. Lavras.
- JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbial Ecology**. v. 3. n. 9. p.1004-1011. Sept. 2009.

- JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.40. n.8. p.769-776. 2005.
- KENNEDY, A.C.; PAPENDICK, R.I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**. v.50. p.243-248. 1995.
- KIRIA, C.T.; ANDRADE, R.P.; CHARCHAR, M.J.D. GOMES, A.C. **Caracterização Morfológica de Acessos do gênero *Stylosanthes* no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados – Coleção 1994/1995**. Planaltina – DF. Embrapa Cerrados. 2002.
- KIRIA, C.T.; ANDRADE, R.P de. Avaliação preliminar de espécies forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados: perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS. I.; 1996. Brasília. **Anais....** Planaltina:Embrapa-CPAC. p.471-475. 1996.
- KIRKBRIDE JUNIOR, J. H.; KIRKBRIDE, M. C. G. Typication of *Stylosanthes* (Leguminosae) and Its Sections. **Taxon**. v. 36. n. 2. May. P.455-458. 1987.
- LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**. Viçosa. v.51. n.293. p.67-82. 2004.
- LAJUDIE, P. de; WILLENS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**. Washington. v. 48. n. 2. p.369-382. 1998.
- LAZARO, C.C.M. Efeito do Sombreamento em variedades de *Stylosanthes guianensis*.(Dissertação) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp. Jaboticabal SP. 2007.
- LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of Rhizóbia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.33. p.1215 – 1226. 2009.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, Z. A.; WONG, C. H.; NELSON, L.; MANEN, J. F.; STANLEY, J.; DOWLING, D. N.; DÉNARIE, J.; ROUGHTON, W. J. Multiple host-

specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**. Dordrecht. v. 8. n. 6. p. 447-459.1987.

LEWIS, G. L.; MACKINDER B.; LOCK. M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens. Kew. p.578, 2005.

LEWIS, G. P.. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens. Kew. 369 p. 1987.

LI, J.H. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**. v.40. p.238-246. 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**. v. 319. p.127-145. 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40. n.11. p.1095-1104. 2005.

MAYNAUD, G.; WILLEMS, A.; SOUSSOU, S.; VIDAL. C.. MAURÉ, L.; MOULIN, L.. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings. and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov.. the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. **Syst Appl Microbiol**. 35: 65–72. 2012.

MALLAIAH, S.H. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Ecology**. v.22. p.29-38. 1997.

MAPA - Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Recuperação de áreas degradadas. Programa ABC. 2011.

BRASIL. MAPA (Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento) (2006) Instrução normativa n.10. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16735>. Acessado em 27/01/2014.

BRASIL. MAPA (Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento) (2011). Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agronômica de cepas. inoculantes e tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. Instrução normativa n.13. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16735>. Acessado em 27/01/2014.

- MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas. v. 30. n. 2. p.230-243. 2006.
- MENDONÇA-SANTOS, M. L.; SANTOS, H. G.; COELHO, M. R.; BERNARDI, A. C. C.; MACHADO, P. L. O. A.; MANZATTO, C. V.; FIDALGO, E. C. C. Solos e ocupação das terras na Amazônia Brasileira. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA. 2008. 768p.
- MILES, J. W.; LASCANO, C. E. Status of *Stylosanthes* development in other countries. I. *Stylosanthes* development and utilization in South América. **Tropical Grasslands**. v.31. p.454-459. 1997.
- MILES, J.W. Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of out crossing rate in *Stylosanthes guianensis*. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.36. p.259-265. 1985.
- MIRANDA, C. H. B.; FERNANDES, C. D. E CADISH, G. Quantifying the nitrogen fixed by *Stylosanthes*. **Pasturas Tropicales**. v.21, p.64-69. 2009.
- MOCHIUTTI, S.; MEIRELLES, P. R.L.M.; SOUZA FILHO, A. P. S. **Efeito da frequência e época de roçada sobre a produção e rendimentos das espécies de uma pastagem nativa de cerrado do Amapá**. 2005 In: Disponível em <http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/For%5CFOR126.htm>. Acesso em 28 Janeiro. 2014.
- MOHLENBROCK, R. H. A revision of the genus *Stylosanthes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v.44, p.299-355. 1958.
- MOHLENBROCK, R. H. Further Consideration in *Stylosanthes* (Leguminosae). **Rhodora**: v.65, p.245-258. 1963.
- MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 152 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí.
- MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereinae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 29. n. 3. p. 197-206.

- MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 16. n. 1. p. 135-146.1993.
- MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. **Molecular Ecology**. v. 7. n. 7. p. 889-895. July 1998.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª Ed. Lavras: UFLA. 2006. 729 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA. 2008.768 p.
- MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA. 2010.
- NEVES, M.C.P.; MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. **Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. (Embrapa - CNPAB. Documentos. 46). 10p. 1998a.
- NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo. ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras. Lavras. 188 p. 2006.
- NORRIS, D.O. The intelligent use of inoculation and lime pelleting for tropical legumes. **Tropical Grasslands**. v.1. p.107-121. 1967.
- OLIVEIRA, O.C.; OLIVEIRA, I.P.; FERREIRA, E.; ALVES, B.J.R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C.H.B.; VILELA, L.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro**. In: Simpósio Nacional De Recuperação De Áreas Degradadas. 3.Ouro Preto. 1997. Anais. Ouro Preto. 1997. p.110-117.
- PAAU, A. S. Improvement of *Rhizobium* inoculants. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55. n.1. p.862-865. 1989.
- PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, M. M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e

- consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 38. n. 3. 2003. p. 421-426
- PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbio isolado de diferentes sistemas de uso da terra na região Amazônica**. Tese (Doutorado). 2000. UFLA. Lavras - MG.
- POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. Advances in legume systematics. **Royal Botanic Gardens**. Kew. v.1; 425p. 1981.
- PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and crop field from Eastern India. **Plant and Soil**. v.175.p.85-91. 1994.
- QUECINI, V.M.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, A.C.; VIEIRA, M.L.C. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. **Genetics and Molecular Biology**. v.25, p.73-80. 2002.
- RAJENDRAN, G. *et al.* Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by coinoculation of Bacillus strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**. Essex. v.99. p.4544-4550. 2008.
- SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; BORGES, W.L.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; NASCIMENTO, L.R.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; BEZERRA, R.V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guianensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira Ciência Agrária**. v.2. n.1. p.20-27. 2007.
- SÁ, N.M.H.; SCOTTI, M.R.M.L.; VARGAS, M.A.T.; DÖBEREINER, J. Resistência natural a estreptomicina e eficiência de estirpes de *Rhizobium* nativas nos cerrados associados a Stylosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.18. n.3. p.213-218, 1983.
- SAIDI, S. MNASRI. B. AND MHAMDI, R. Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. **Syst Appl Microbiol**. v.34, p.524-530. 2011.
- SILVA, M. P.; ZIMMER. A. H. Avaliação agronômica de consorciações de braquiárias e *Andropogon gayanus* com novos acessos de estilosantes sob pastejo. **Anais...** 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campo Grande. MS. 2004.
- SCHULTZE-KRAFT, R.; GIACOMETTI, D.C. Genetic resources of forage legumes for the acid, infertile savannas of tropical America. In: SÁNCHEZ. P.A.; TERGAS. L.E. (Eds). **Pasture production in acid soils of the tropics: proceedings of a seminar held at CIAT. Cali. Colombia. 17-21 April 1978. p. 55-64.**

- SCHULTZE-KRAFT. R.; COSTA. N.M.S.; FLORES. A. *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr. et S. COSTA: collection and preliminary agronomic evaluation of a new tropical pasture legume. **Tropical Agriculture**. v.61. p.229-240. 1984.
- STACEY. G.; BURRIS. R.H.; EVANS. H.J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. 1992. 943p.
- STACE. H.M.; EDYE. L.A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press. 1984.
- STACE, H.M. Breeding system in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australia Journal of Agricultural Research**. v.33. p.87-96. 1984.
- STACE, H.M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and evolution of in *Stylosanthes*. In: STACE. H. M.; Edye, L. A.. eds. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press. p.49 – 71. 1984.
- STANDLEY WILLIAM, L. In: MOHLENBROCK, R.H.A. A Revision of the genus *Stylosanthes*. **Annals of Missouri - Botanical Garden**. Washington. 44: 299-354. 1957
- SILVA, K. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região Amazônica**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras. Lavras. 83 p. 2006.
- SILVA, F.V.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; SILVA JÚNIOR, J.P.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Genetic diversity of rhizobia isolates from Amazon soils using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant. **Brazilian Journal Microbiology**. v.43. 682-691. 2012.
- SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H. A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos zootecnia**. vol.59. n.225. pp. 21-30. 2010.
- SILVANI, V. A. *et al.*. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. **Soil Biology & Biochemistry**. V.40, p.1259-1263. 2008.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA. J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência Agronômica de Rizóbios Seleccionados e Diversidade de Populações Nativas Nodulíferas em Perdões (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.30. p.795-802. 2006.
- SOUSA, D. P.; LIMA, K. T; OLIVEIRA, A. L.; QUEIROZ. R. F.; FERNANDES NETO, R. F. P. A. G.; NUNES, E. P. Estudo do taxon gênero *Stylosanthes* (Leguminosae) no estado do

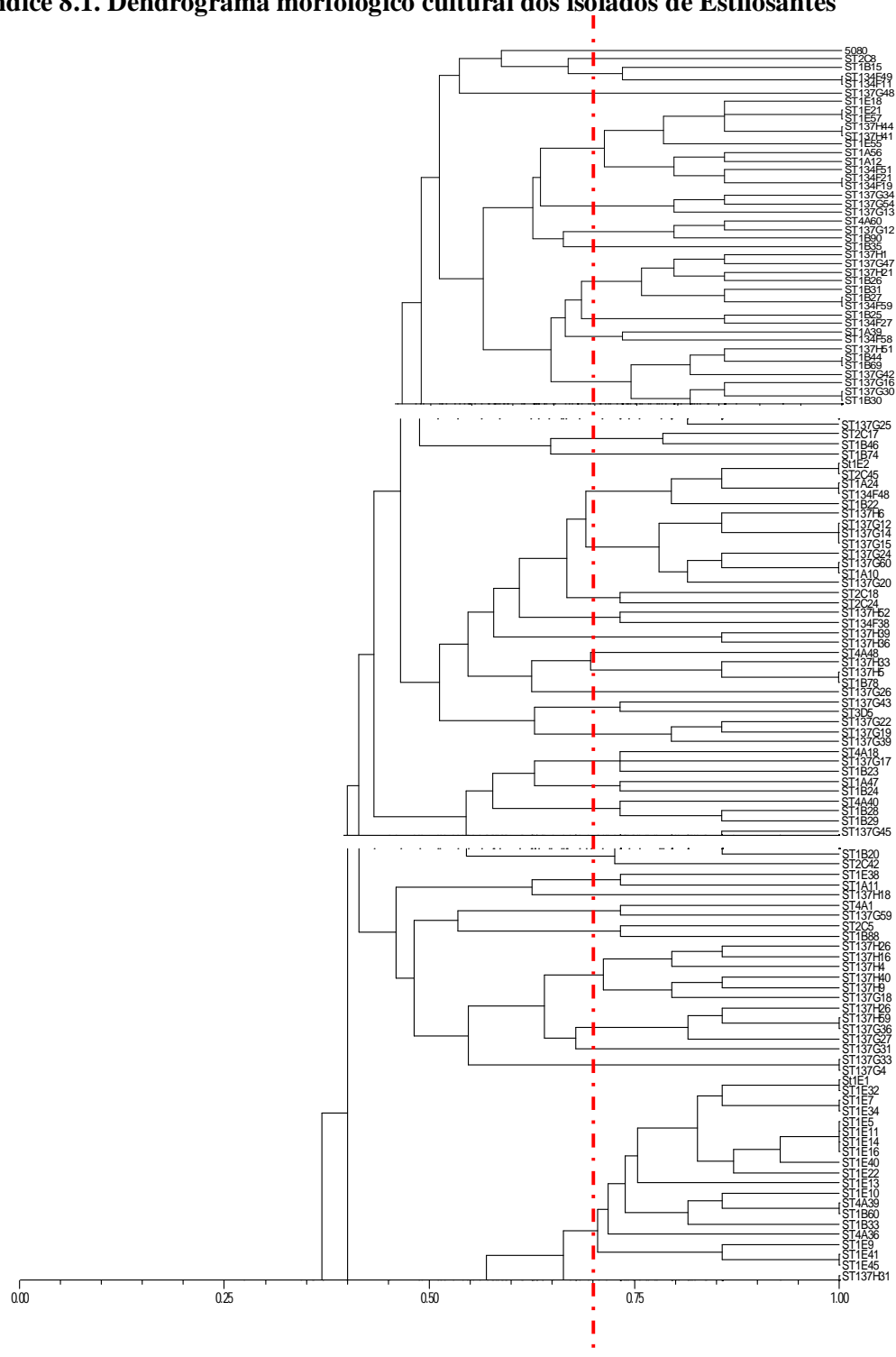
- Ceará. In: 54º Congresso de Botânica e 3ª Reunião Amazônica de Botânica – Resumos. Belém-Pará. 97p. 2003.
- SOUTO, S.M.; CÓSER, A. C.; DÖBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de alfafa do nordeste (*Stylosanthes gracilis*) na simbiose com *Rhizobium* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Série Zootecnia. v.7. p.1-5. 1972.
- SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; MACIEL, C. D.; CAMPO, R. J.; ZAIA, D. A. M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43; p.83-91. 2008.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.M; AYARZA, M.A.; MÉNDEZ, J.E.; MORIONES, M. Use of undisturbed soil cores for evaluation of *Rhizobium* strain and methods for inoculation of tropical forage legumes in Colombian Oxisol. **Plant and Soil**. v.74. p.237-247. 1983.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of de Cawpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. For *Vigna unguiculata*. *Phaseolos lanatus*. *Arachis hipogaea* and *Macroptilum atropurpureum*. **Applied Environmental Microbiology**. Washington. D.C. v.57. n.5. p.1540-1545. 1991.
- TARAWALI, G.; DEMBÉLÉ, E.; N'GUESSAN, B.; YOURI, A. Smallholders' Use of *Stylosanthes* For Sustainable Food Production In Subhumid West Africa. In: **International Workshop on Green-Manure Cover Crop Systems for Smallholders in Tropical and Subtropical Regions**. 6–12 Apr 2005. Chapecó. Brazil. Doc. 18. Disponível em: http://www.crdi.ca/es/ev-31918-201-1-do_TOPIC.html.
- THOMAS, D. Global ventures in *Stylosanthes* I. South America In: STACE, H. M.; EDYE. L.A.. eds. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press. p.49 –71. 1984.
- T'MANNETJE, L. *Rhizobium* affinities and phenetic relationships within the genus *Stylosanthes*. **Australian Journal of Botany**. 17: 553-564. 1969.
- VALE JÚNIOR, J.F.; SCHAEFER, C. E. G.R. **Solos sob savanas de Roraima: gêneses, classificação e relações ambientais**. Boa Vista – RR. Gráfica Ioris. 2010. 219p.
- VARGAS, M.A.T.. PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. Fixação de N₂ por leguminosas forrageiras e de adubo verde em solos de cerrados In: FUNDAÇÃO CARGILL. **Adubação verde no Brasil**. Campinas. p.50-63. 1994.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1997. 524p.

- VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Eficiência de inoculantes comerciais e de estirpes de *Rhizobium* para seis leguminosas forrageiras em um solo de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.16. n.3. p.357-362. 1981.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodulate bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1970. p 164.
- WILLIAMS, R.J.; REID, R.; SCHULTZE-KRAFT, R.; SOUSA COSTA, N.M.; THOMAS, B.D. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Eds) **The Biology and Agronomy of *Stylosanthes***. Academic Press: Australia. 1984. p. 73-101.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**. v.19; p.25-33. 2006.
- XAVIER, D.F.; SOUTO, S.M.; CARVALHO, M.M.; FRANCO, A. A. Resposta de acessos nativos de *Stylosanthes guianensis* à inoculação com rizóbio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 25: 1733-1738. 1990.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**. 19:25-33. 2006.
- YUAN, Z. L. *et al.* A new species of *Harpophora* (*Magnaporthaceae*) recovered from healthy wild rice (*Oryza granulata*) roots. representing a novel member of a beneficial dark septate endophyte. **FEMS Microbiology Letters**. 307: 94–101. 2010.
- ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**. v. 21. p. 569-576. 2001.
- ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L'TAIEF, B.; EL AOUNI, M.H.; DREVON, J.J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. **Experience Agrícola**. v.43; p.67-77. 2007.
- ZILLI, J. É.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41. p. 811-818. 2006.
- ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa – Roraima. 2008. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico. 10).

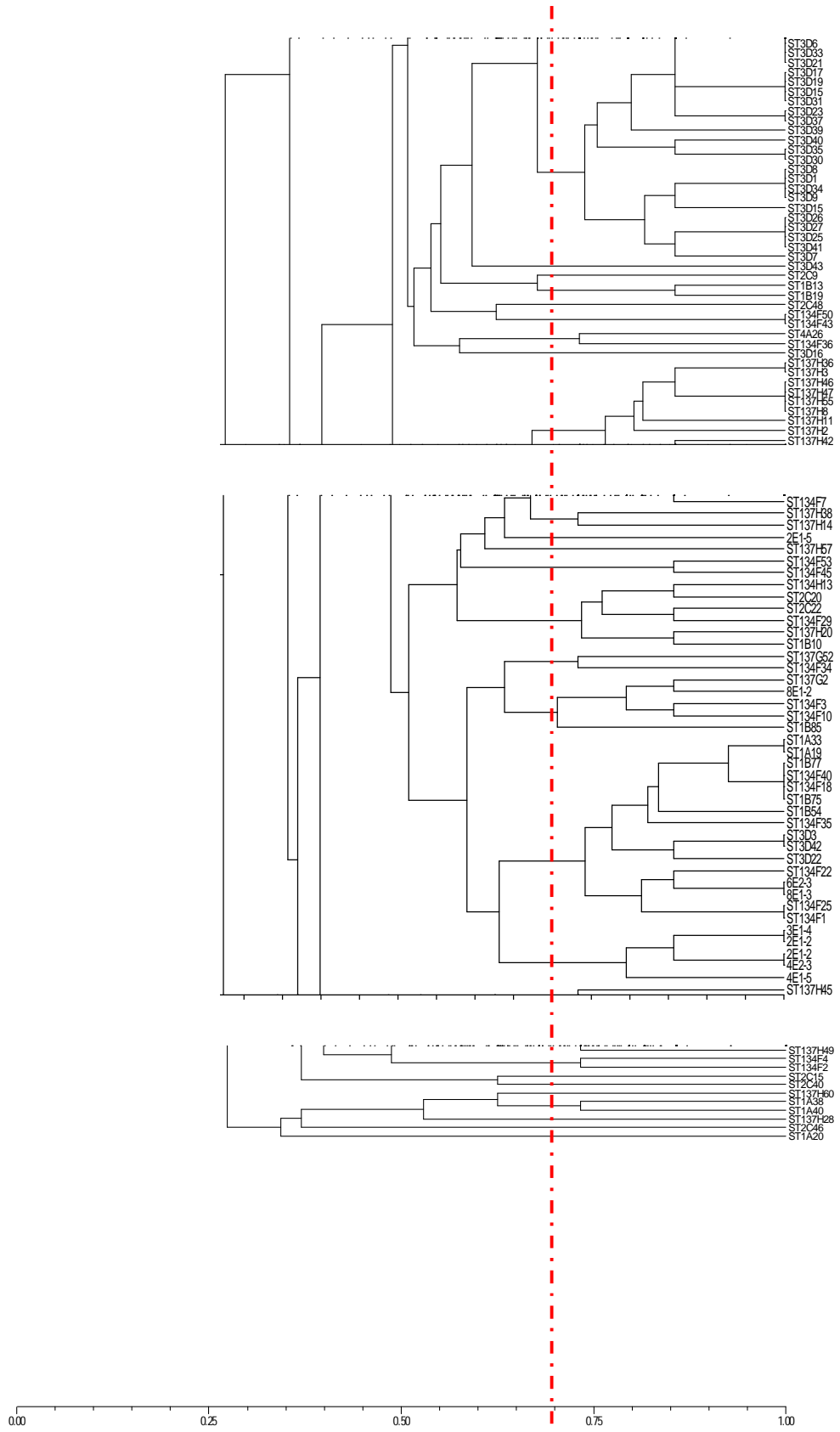
ZILLI, J. E.; MARSON, L.C.; MARSON, B.F.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.
Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de
feijão-caupi em Roraima. **Revista Acta Amazônica**. 2009.

8. APÊNDICE

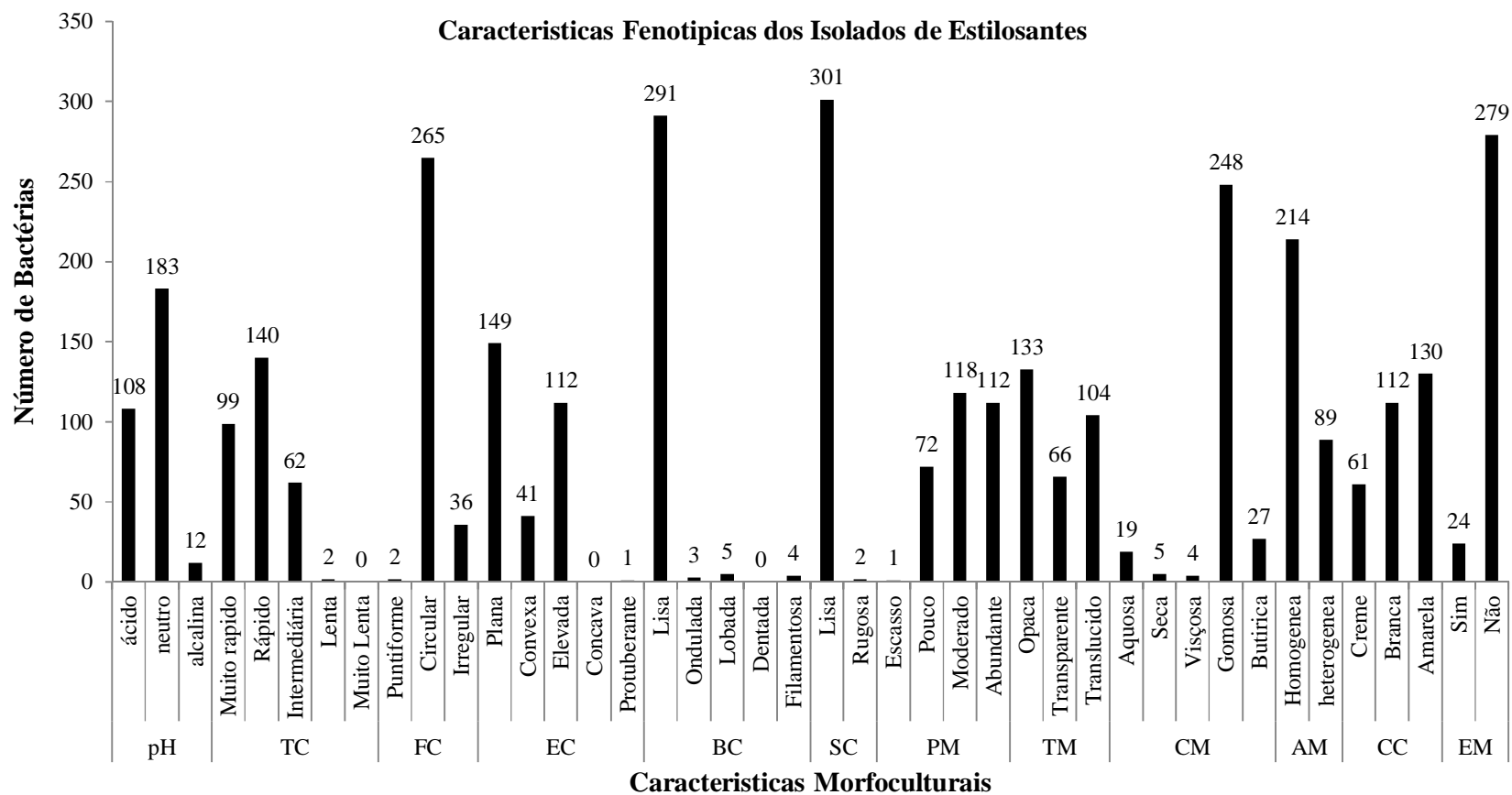
Apêndice 8.1. Dendrograma morfológico cultural dos isolados de Estilosantes







Apêndice 8.2. Características fenotípicas dos 303 Isolados de Estilosantes: pH (potencial de Hidrogênio) TC (tempo de crescimento); FC (forma da colônia); EC (elevação da colônia); BC (borda da colônia); SC (superfície da colônia); PM (produção de muco); TM (transparência do muco); CM (consistência do muco); AM (aparência do muco); CC (cor da colônia) e EM (elasticidade do muco).



Apêndice 8.3. Resumo da ANAVA para as variáveis NN, MSN, MSPA e N total.

Quadrados Médios					
Fator de variação	GL	NN	MSN	MSPA	N total
Tratamentos	46	1.551*	0.266*	17.85 ^{ns}	0.38 ^{ns}
Resíduos	141	0.877	0.153	19.45	0.36
CV (%)	-	38.96	28.01	30.41	24.23

*. Ns, significativo a 5% de probabilidade e não significativo pelo teste de F respectivamente.

Apêndice 4. Visão geral do experimento de autenticação em casa de vegetação com feijão caupi.



Fonte: Embrapa Roraima

Apêndice 8.5. Visão geral do experimento de eficiência simbiótica em casa de vegetação, em vasos com solo estéril, utilizando *Stylosanthes capitata* cv. lavradeiro.



Fonte: Embrapa Roraima

Apêndice 8.6. Experimento em casa de vegetação - Comparação do desenvolvimento das plântulas inoculadas. BR446 estirpes recomendadas para estilosantes; (Nitrogenado) planta com N mineral e sem inoculação; (Controle) planta sem inoculação e sem N mineral e (4A29 e F29) planta inoculada com estirpes em estudo.



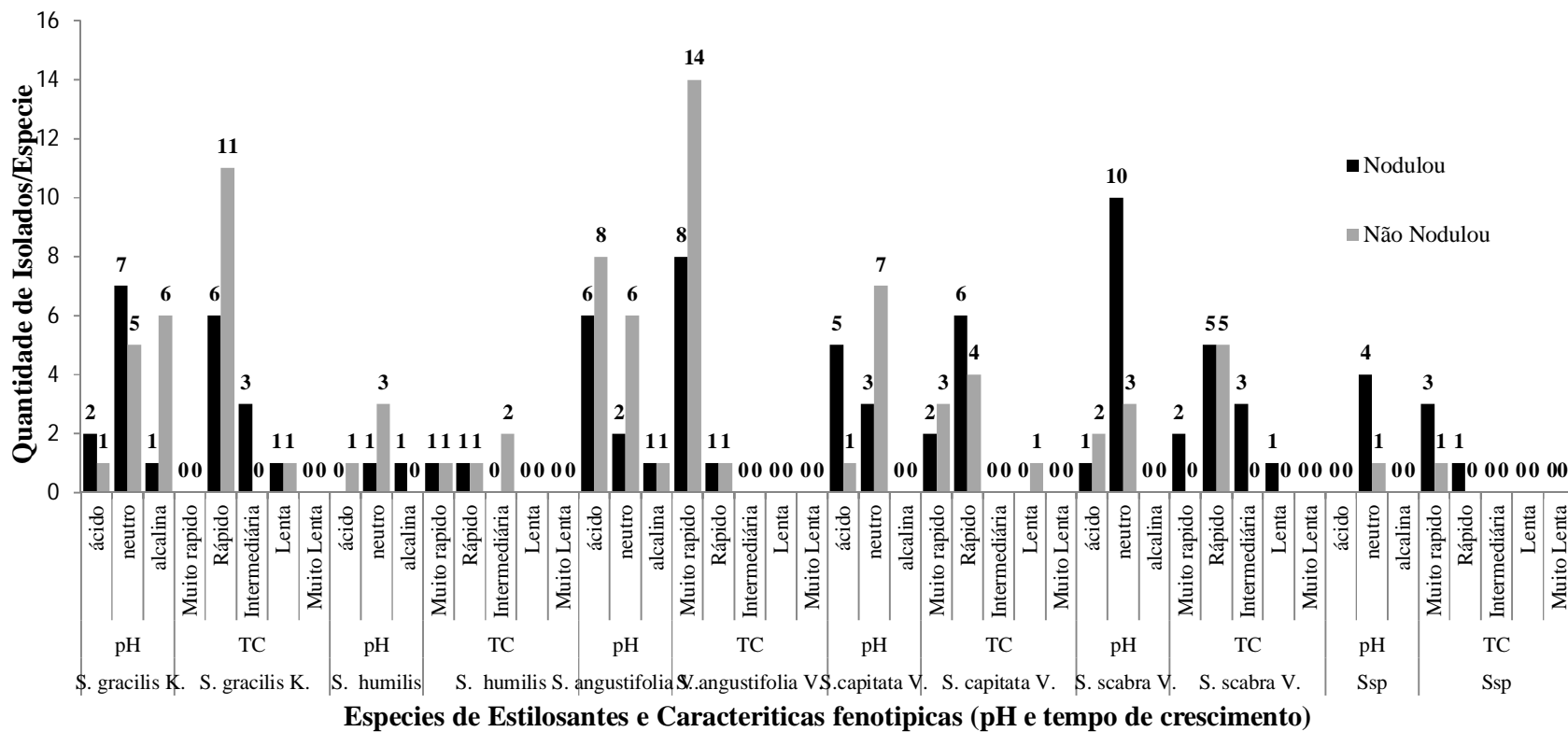
Fonte: Embrapa Roraima

Apêndice 8.7. Autenticação de 89 isolados quanto à nodulação em feijão-caupi, isoladas de nódulos de cinco espécies de estilosantes nativos e cultivados em Roraima.

Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação
1A39	+	F38	-	G31	-
2C18	+	G57	+	3D16	+
4A29	+	1B85	+	1E37	+
1B21	+	H18	-	3D5	+
4A46	-	1B75	+	F5	-
2C48	-	4A1	-	4A11	-
2C 17	-	4A48	+	2E1-2	+
G30	+	2C22	+	1B10	+
4A24	-	1A40	+	H5	+
1B61	+	4A16	-	H14	-
3D20	+	G25	-	1B25	-
G52	+	1A24	+	4A28	-
2C46	-	H49	-	2C5	+
G36	-	G33	+	4A17	-
1B27	+	2C45	-	F43	-
6E2-3	+	1A11	+	G26	-
1B90	-	4A21	-	1B23	-
H28	-	1A8	+	2C15	-
F45	+	2C7	-	1B13	+
2C9	+	2C8	-	4A47	-
2E1-5	+	H36	+	F29	+
1B35	-	1B28	+	H4	-
G48	-	8E1-2	-	F49	-
H60	-	1A20	-	1B34	-
1E52	+	1B33	+	4A34	-
H41	+	2C40	-	4A6	-
G60	-	G19	-	1E6	+
1B74	+	H31	-	G54	+
1E57	+	G21	+	1B20	+
H57	-	1E1-2	+	-----	-----
				-----	-----

Sinal positivo (+) e sinal negativo (-) indicam presença ou ausência de nódulos nas plantas de feijão caupi respectivamente.

Apêndice 8.8. Distribuição dos isolados autenticados em feijão caupi em relação à ocorrência de nodulação.



Apêndice 8.9. Identificação das espécies de estilosantes no Cerrado de Roraima

No Brasil muitas espécies de *Stylosanthes* são encontradas no Cerrado, onde apresentam adaptação a solos de pH baixo, alto nível de saturação por alumínio e baixa fertilidade (COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2008). Neste trabalho foram identificadas 5 espécies do gênero *Stylosanthes*, 3 no município de Boa Vista no Campo Experimental Água Boa - Embrapa Roraima (*Stylosanthes capitata* Vogel, *Stylosanthes scabra* Vogel e *Stylosanthes gracilis* Kunth) e 2 no município de Bonfim em áreas de produtores rurais (*Stylosanthes humilis* Kunth e *Stylosanthes angustifolia* Vogel) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características dos locais de coleta e espécies de *Stylosanthes* spp. no Cerrado de Roraima.

Local	Características do local	Espécies
P1	Área de integração	<i>S. capitata</i> Vogel
	Lavoura pecuária floresta	<i>S. scabra</i> Vogel
		<i>S. gracilis</i> Kunth
P2	Área de pastagem plantada	<i>S. capitata</i> Vogel
P3	Capim nativo	<i>S. gracilis</i> Kunth
P4	Próximo de lavoura de soja	<i>S. humilis</i> Kunth
P5	Próximo de lavoura de soja	<i>S. angustifolia</i> Vogel
P6	Próximo de lavoura de arroz	<i>S. angustifolia</i> Vogel
-	-	<i>Stylosanthes</i> sp
-	-	<i>S. capitata</i> Vogel
Total		5

Fonte: Josimar Chaves e Krisle da Silva

8.9.1. *Stylosanthes capitata* Vogel

As plantas de *S. capitata* Vogel possuem hábito de crescimento ereto, atingindo até 1,5 m de altura, com folhas arredondadas e inflorescência em espiga capitada que variam do amarelo ao bege (COSTA *et al.*, 2008) (**Figura 1**). Foi encontrado em dois pontos distintos no Campo Experimental da Embrapa Roraima (**Tabela 1**), no P1 em área próxima ao experimento de integração lavoura pecuária floresta (ILPF) e no P2 em uma área de pastagem plantada. *Stylosanthes capitata* tem distribuição ampla no país, ocorrendo nos estados do Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Maranhão, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Ceará, Bahia e Mato Grosso do Sul (BRANDÃO e COSTA, 1979; COSTA, 2007), e certas regiões da Venezuela. De ocorrência em áreas de savana (Cerrado), savana florestada (cerradão), savana gramíneo-lenhosa (campo-sujo). Floresce e frutifica simultaneamente de novembro a

julho. É uma planta perene, que se desenvolve em solos com baixo valor de pH e baixa fertilidade e não cresce bem em solos férteis, além disso apresenta tolerância a antracnose (SCHULTZE-KRAFT e GIACOMETTI, 1978; GROF *et al.*, 1979). Essas características foram encontradas nas áreas de coleta da espécie. Estas características agronômicas da espécie, e as propriedades químicas da maioria dos solos da Amazônia, torna o *Stylosanthes capitata* uma forrageira de potencial para o uso em áreas de pastagens no cerrado de Roraima.



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

8.9.2. *Stylosanthes scabra* Vogel

Subarbusto ereto, 40-150 cm altura, caule e ramos glabros, inflorescência em espiga fasciculada, 1–2 espigas oblongas, elípticas e largo-elípticas, terminais e axilares (COSTA *et al.*, 2008)(**Figura 2**), foi coletada no P1 em área próxima ao experimento de integração lavoura pecuária floresta. É amplamente distribuída no norte da América do Sul (Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Norte da Argentina) (EDYE e MAASS, 1997). No Brasil, a espécie ocorre nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Bahia, São Paulo e Minas Gerais (BRANDÃO e COSTA, 1979). Geralmente verifica-se a ocorrência de *S. scabra* associado a *S. acuminata* e *S. grandifolia*. Podem ser encontrada em savana (cerrado), savana florestada (cerradão) e savana gramíneo-lenhosa (campo sujo). Floresce e frutifica simultaneamente de outubro a julho (COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2008). Assim como *S. capitata* esta espécie se desenvolve em solos ácidos e de baixa fertilidade (SCHULTZE-KRAFT e GIACOMETTI, 1978), condições estas presente no local em que a espécie foi coletada. Pode ser usada como uma forrageira perene, em plantios solteiros ou consorciada com gramíneas.



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

8.9.3. *Stylosanthes gracilis* Kunth

Stylosanthes gracilis é facilmente identificada pela presença de folíolos lineares ou lanceolados, de ápice apiculado. Arbusto ou subarbusto 90-150 cm de altura, ereto, caule estriado e ramos vilosos, folhas com 13 mm de comprimento, pecíolo glabro, folíolo linear, lanceolado, inflorescência em espiga capitada. Esta espécie é encontrada em Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima e Acre (BRANDÃO e COSTA, 1979; COSTA *et al.*, 2008). Floresce e frutifica de dezembro a julho (COSTA, 2007).

Esta espécie (**Figura 3**) foi coletada em duas áreas, uma no P1, próximo ao experimento de integração lavoura pecuária floresta e no P3, uma área de Cerrado com capim nativo, no Campo Experimental da Embrapa Roraima. *S. gracilis* ocorre exclusivamente em áreas abertas e secas, principalmente em savanas, em solos ácidos e mais arenosos e é adaptada ao fogo, é ereta e perene (CALLES e SCHULTZE-KRAFT, 2010a). Estas condições são similares às encontradas no cerrado de Roraima.



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

8.9.4. *Stylosanthes humilis* Kunth

O *Stylosanthes humilis* Kunth é facilmente reconhecida pelo fruto com um artículo fértil, vestígio de um segundo artículo, tomentoso a esparso-tomentoso, e por não possuir eixo plumoso, caracteres que a diferenciam de *S. hamata*. *S. humilis* e *S. linearifolia* que apresentam estípula oblonga ou elíptica, mas diferem pelo fruto com um estilete residual longo-uncinado *versus* estilete residual. Tem como origem América Central e provavelmente América do Sul e trata-se de uma planta anual ou bianual (ALCÂNTARA e BURAFÁH, 1999) e geralmente com crescimento prostrado (CALLES e SCHULTZE-KRAFT, 2010b). Registros de ocorrência dessa espécie nos Estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Piauí, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco e Roraima (BRANDÃO e COSTA, 1979; COSTA *et al.*, 2008; CAVALCANTE, BARBOSA e FLORES, 2009). Floresce e frutifica de setembro a novembro (COSTA, 2007; 2008).

Neste estudo *S. humilis* foi encontrado em propriedades particulares no município de Bonfim, P4, próximo à lavoura de soja (**Tabela 1**), em solo com boa fertilidade. *Stylosanthes humilis* Kunth (**Figura 4**), possui grande capacidade de se adaptar a solos de baixa fertilidade natural e também possui a capacidade de responder a aplicação de nutrientes, principalmente fósforo (GATES e WILSON, 1974). Este potencial de resposta à adubação fosfatada foi verificado neste trabalho pelo bom vigor vegetativo das plantas e o teor de fósforo considerado bom nesta área de coleta.



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

8.9.5. *Stylosanthes angustifolia* Vogel

Stylosanthes angustifolia Vogel é prontamente identificada por formar um subarbusto ereto, com 70-110 cm de altura, ramificado, caule e ramos vilosos e inflorescências deste ovóides a circulares. Aproxima-se de *S. acuminata* pela coloração dos ramos, folíolos e frutos,

e de *S. gracilis* pela forma e indumento das inflorescências e dos frutos. Porém difere de ambas pelos folíolos lineares ou lanceolados desprovidos de nervuras. Floresce e frutifica de dezembro a fevereiro (COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2008).

Trata-se de uma planta perene, encontrada na Venezuela, Guiana, Suriname e Brasil (WILLIAMS *et al.*, 1984). Costa e Brandão, (1979) descrevem a sua ocorrência em Minas Gerais e em Mato Grosso do Sul (COSTA, 2007; COSTA *et al.*, 2008). Neste trabalho, essa espécie foi encontrada em duas propriedades particulares, P5 e P6, próximo às lavouras de soja e arroz, respectivamente (**Tabela 1**). Estas áreas apresentam fertilidade média, com exceção do elemento fósforo que está no nível bom. É considerada uma planta indicadora de solos ácidos e de baixa fertilidade natural (SCHULTZE-KRAFT e GIACOMETTI, 1978).



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

Anexo 1. Composição da solução de Hoagland e Arnon modificada (¼ força) usada na autenticação em feijão-caupi.

Reagentes	Concentração dos reagentes soluções		Volume pipetado* (mL)
	Estoque		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1M		0.1
KNO ₃	1M		0.6
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1M		0.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1M		2
K ₂ SO ₄	0.5M		4.5
CaHPO ₄	0.05M		10
KH ₂ PO ₄	0.0025M		10
Solução de micronutrientes	(H ₃ BO ₃ 2.86 mg; MnSO ₄ .4H ₂ O 2.03 mg; ZnSO ₄ .7H ₂ O 0.22 mg; CuSO ₄ .5H ₂ O 0.08 mg e Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O 0.09 mg). L ⁻¹		1
Ca ₂ SO ₄	0.43 g.L ⁻¹		800
Solução Fe-EDTA	(EDTA 26.1g; NaOH 89.2g; FeSO ₄ .7H ₂ O 24g). L ⁻¹		1

*Volume referente ao preparo de 4L de solução nutritiva ¼ de força.