



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

ALEXANDRE CARDOSO BARAÚNA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS  
ISOLADOS DE NÓDULOS DE PAU-RAINHA (*Centrolobium paraense* Tul.)**

BOA VISTA, RR

2013

ALEXANDRE CARDOSO BARAÚNA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS  
ISOLADOS DE NÓDULOS DE PAU-RAINHA (*Centrolobium paraense* Tul.)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Jerri Édson Zilli  
Coorientadora: Dra. Krisle da Silva

BOA VISTA, RR

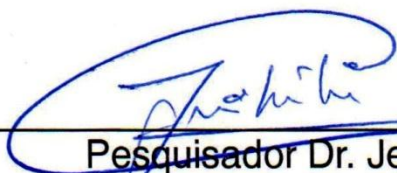
2013

## ALEXANDRE CARDOSO BARAÚNA

Diversidade e eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isolados de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense Tul.*)

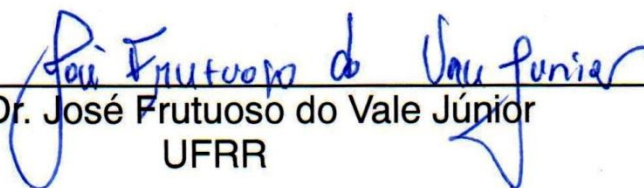
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

Aprovado: 25 de fevereiro de 2013.



---

Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli  
Orientador – Embrapa Agrobiologia



---

Prof. Dr. José Frutuoso do Vale Júnior  
UFRR



---

Pesquisadora Dra. Carolina Volkmer de Castilho  
Embrapa Roraima



---

Pesquisadora Dra. Krisle da Silva  
Embrapa Roraima

## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente à Deus, que me guiou e deu forças para alcançar meus objetivos, principalmente nas horas de desânimo e incertezas dos rumos que tomaria para minha vida.

Aos meus pais, Rui Antônio do Carmo Baraúna e Nilva Cardoso Baraúna, que pela fé em Deus, sempre me deram orgulho e exemplo de honestidade e perseverança, valores estes que me guiaram em busca dos meus sonhos.

Aos meu amigos, familiares, e em especial, à minha namorada Jomara Figueiredo Lopes, que me acompanhou e ajudou nas tomadas de decisões, mesmo abdicando da minha presença física, mas tendo a certeza que estaria sempre ao seu lado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – POSAGRO, que por meio da coordenação e de seu corpo docente foi fundamental para minha formação acadêmica na área de agronomia.

À Embrapa Roraima, pela sua excelente equipe de pesquisadores, colaboradores e suas estruturas laboratoriais que forneceram as condições necessárias para execução deste trabalho.

À CAPES, pelo o apoio financeiro durante todo o período letivo deste mestrado, cumprindo rigorosamente as datas de pagamentos da bolsa de estudo, a qual foi importante para que eu dedicasse toda atenção às pesquisas científicas.

Ao meu orientador Dr. Jerrí Édson Zilli e coorientadora Dra. Krisle da Silva, que são muito mais que apenas colegas de trabalho, e sim verdadeiros amigos, que contribuíram com este e outros trabalhos realizados na Embrapa Roraima, sempre com humildade, respeito e dedicação.

Aos colaboradores de Pós-Doutorado que trabalharam nos Laboratórios de Microbiologia do Solo e Biotecnologia da Embrapa Roraima, Dra. Gilmara Maria de Duarte Pereira, Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior, e em especial, à Dra. Liamara Perin, pela paciência e atenção dada a mim no início dos trabalhos em laboratório, ensinando diversas técnicas de microbiologia e biologia molecular, as quais foram essenciais para execução dos trabalhos e compreensão dos resultados.

À Dra. Carolina Volkmer de Castilho, pela sua prestatividade em ajudar na realização deste trabalho, cedendo equipamentos, sementes de pau-rainha, materiais bibliográficos e dados referentes as áreas de coletas.

Não menos importantes, aos meus amigos de laboratório, Aliny Maria Ribeiro de Mello, Eliane do Nascimento Cunha, Luana Mesquita, Izaias França Junior, Manoel Luiz da Silva Neto, Cátia Aparecida Mosqueira, Francilene Muniz

Alves, Ismaele Breckenfeld, Anderson Strücker, Patricia Bombonati, Josimar Silva da Chaves e Joselma Pedrosa da Silva, pela ajuda na realização deste trabalho e de muitos outros, sempre com o sentimento de companherismo, comprometimento e humildade, como verdadeiros pesquisadores, os quais tenho muito orgulho de ter trabalhado lado a lado, compartilhando conhecimento, experiências e muita alegria no cotidiano do laboratório.

Aos meus colegas da graduação e de mestrado, pela colaboração nos grupos estudos e elaboração de trabalhos.

## BIOGRAFIA

Alexandre Cardoso Baraúna, nascido em 17 de outubro de 1987, filho de Rui Antônio do Carmo Baraúna e Nilva Cardoso Baraúna, iniciou sua carreira acadêmica aos 17 anos quando saiu do terceiro ano do ensino médio da Escola Estadual Ana Libória em 2005 para ingressar no curso de graduação de Ciências Biológicas na Faculdade Cathedral durante 2 anos letivos.

Em 2007 ingressou na Universidade Federal de Roraima (UFRR) no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia. Ao longo da graduação participou do Programa de Ensino Tutorial de Biologia (PET-Bio) durante um ano quando saiu, em maio de 2009, para iniciar seu estágio voluntário no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa-RR sob responsabilidade do pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli. Neste mesmo ano iniciou sua primeira participação em projeto de pesquisa através do Programa de Iniciação Científica (PIC-UFRR) sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr. Gilmara Maria de Duarte Pereira e Liamara Perin, trabalhando com Bactérias diazotróficas endofíticas de milho do Estado de Roraima. Em 2010 submeteu-se a defesa de seu trabalho de conclusão de curso. Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia (POSAGRO) da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, sob orientação do Prof<sup>o</sup> Jerri Édson Zilli, submetendo-se a defesa de dissertação em 25 de fevereiro de 2013 tendo como título: Diversidade e eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isolados de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.).

BARAÚNA, Alexandre Cardoso, **Diversidade e eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isoladas de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.)**. 2013, 92f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

## Resumo

*Centrolobium paraense* Tul. conhecida popularmente como pau-rainha é uma leguminosa arbórea que ocorre em ilhas de mata, florestas de transição e matas de galerias das savanas de Roraima. Esta leguminosa se beneficia do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da simbiose com bactérias do grupo rizóbio. No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade e a eficiência dessas bactérias em simbiose com pau-rainha. Este estudo teve como objetivo a caracterização de rizóbios associados às raízes de pau-rainha em Roraima, bem como a avaliação da eficiência simbiótica na promoção do crescimento de mudas através da FBN. Para isso, plantas de pau-rainha foram cultivadas em solos coletados em ilhas de mata localizadas nos municípios de Mucajaí, Bonfim, Boa Vista e Normandia para obtenção dos nódulos, e posterior isolamento das bactérias em meio de cultura. As bactérias foram caracterizadas morfolologicamente e agrupadas de acordo com os perfis gerados. Representantes de cada grupo foram avaliados quanto à capacidade de nodulação utilizando o feijão-caupi como planta hospedeira. Os que apresentaram resultados positivos foram caracterizados geneticamente através da técnica de BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*. Em seguida uma nova autenticação foi realizada, e os isolados que repetiram os resultados anteriores ou apresentaram similaridade com espécies reconhecidamente nodulíferas foram selecionados para teste de eficiência em pau-rainha. Para avaliar a eficiência da FBN, os rizóbios foram utilizados na inoculação de plântulas de pau-rainha sob condições estéreis de casa de vegetação durante 100 dias, procedendo à análise estatística para os parâmetros: nitrogênio total, massa seca da parte aérea, área foliar, massa seca de raiz, número de folíolos, altura da planta, diâmetro do caule, massa seca de nódulos e número de nódulos. Os identificados como *Bradyrhizobium* foram avaliados através do sequenciamento de cinco genes *glnII*, *gyrB*, *rpoB*, *recA* e *dnaK* para análise de sequência multilocus (MLSA). De um total de 355 nódulos coletados, foram obtidos 178 isolados, sendo a maioria de crescimento lento com capacidade de alcalinizar o meio de cultura, compatíveis com o gênero *Bradyrhizobium*. A partir da caracterização morfológica foi gerado um dendrograma onde se constatou a formação de nove grupos com perfis distintos. Quarenta isolados foram selecionados para a autenticação e trinta e seis foram capazes de induzir a nodulação. A análise do BOX-PCR revelou-se que estes isolados apresentam pouca semelhança entre eles. No entanto a análise do sequenciamento do gene *16S rRNA*, revelou que a maioria dos isolados pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium*. Estes confirmaram a capacidade de nodulação e foram selecionados para ensaio de eficiência em pau-rainha juntamente com quatro isolados identificados como *Rhizobium tropici* e *Pleomorphomonas oryzae*. Os isolados pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* foram os mais eficientes, com destaque para os isolados ERR 326, ERR 399 e ERR 435 que proporcionaram os melhores resultados em todas as avaliações. A partir da MLSA ficou evidenciado que



os isolados apresentaram grandes divergências com as estirpes de referência de *Bradyrhizobium*, indicando haver espécies novas colonizando o pau-rainha.

**Palavras-chaves:** *Bradyrhizobium*. Leguminosa Arbórea. Amazônia. MLSA. 16S *rRNA*

BARAÚNA, Alexandre Cardoso, **Diversity and symbiotic efficiency of rhizobial strains isolated from nodules of wood-queen (*Centrolobium paraense* Tul.)**.2013, 92f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

### Abstract

*Centrolobium paraense* Tul. popularly known as wood-queen is a leguminous tree that occurs in islands of forest, transition forest and gallery forests of Roraima savannas. This legume benefits from the process of biological nitrogen fixation (BNF) through symbiosis with rhizobia bacteria group. However, little is known about the diversity and efficiency of these bacteria in symbiosis with wood-queen. This study aimed to characterize rhizobia associated with the roots of wood-queen in Roraima, as well as evaluating the symbiotic effectiveness in promoting the growth of seedlings by FBN. For this, plants of wood-queen were grown in soils collected in forest islands located in the municipalities of Mucajaí, Bonfim, Boa Vista and Normandia to obtain the nodules, and subsequent isolation of bacteria in culture medium. The bacteria were morphologically characterized and grouped according to the profiles generated. Representatives of each group were evaluated for nodulation using cowpea as host plant, and those who tested positive were genetically characterized using the technique of BOX-PCR and partial sequencing of the *16S rRNA*. Then a new authentication was performed, and that the isolated or repeated previous results showed similarity with known nodulating species were selected to test efficiency in wood-queen. To evaluate the efficiency of BNF, the strains were used to inoculate seedlings wood-queen under sterile conditions in a greenhouse for 100 days, carrying out statistical analysis for the parameters: total nitrogen, shoot dry weight, leaf area, root dry weight, number of leaves, plant height, stem diameter, dry mass and number of nodes. Those identified as *Bradyrhizobium* were evaluated by sequencing five genes *glnII*, *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *dnaK* for multilocus sequence analysis (MLSA). From a total of 355 nodes collected were obtained 178 isolates, most slow growing with capacity to alkalize the culture medium, compatible with the genus *Bradyrhizobium*. From the morphological characterization of a dendrogram was generated which demonstrated the formation of nine groups with distinct profiles. Forty isolates were selected for authentication and thirty six were able to induce nodulation. A BOX-PCR analysis revealed that these isolates show little similarity between them. However the analysis of *16S rRNA* gene sequencing revealed that most isolates belonged to the genus *Bradyrhizobium*. These confirmed the nodulation and were selected for assay efficiency wood queen with four isolates identified as *Rhizobium tropici* and *Pleomorphomonas oryzae*. The isolates belonging to the genus *Bradyrhizobium* were the most efficient, especially for isolates ERR 326, ERR 399 and ERR 435 that provided the best results in all evaluations. From the MLSA was evident that the isolates showed large differences with the reference strains of *Bradyrhizobium*, indicating a new species colonizing the wood-queen.

**Keywords:** *Bradyrhizobium*. Legumes tree. Amazon. MLSA. *16S rRNA*

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2</b> | <b>Referencial Teórico.....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1      | Savanas de Roraima.....  | 18        |
| 2.2      | Uso de leguminosas arbóreas.....   | 19        |
| 2.3      | <i>Centrolobium paraense</i> Tul.....  | 21        |
| 2.4      | FBN em leguminosas e diversidade de rizóbios.....                                | 24        |
| 2.5      | Rizóbios do gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....                                   | 27        |
| 2.6      | Métodos de caracterização de rizóbios.....                                       | 28        |
| <b>3</b> | <b>Objetivo.....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1      | Objetivo geral.....  | 33        |
| 3.2      | Objetivos específicos.....   | 33        |
| <b>4</b> | <b>Material e Métodos.....</b>   | <b>34</b> |
| 4.1      | Área de estudo, amostragem e processamento do solo.....                          | 34        |
| 4.2      | Experimento para obtenção dos nódulos.....                                       | 34        |
| 4.3      | Isolamento e caracterização morfológica das bactérias.....                       | 36        |
| 4.4      | Estruturação da coleção de culturas.....   | 36        |
| 4.5      | Autenticação dos rizóbios em feijão-caupi.....                                   | 37        |
| 4.6      | Extração de DNA.....   | 38        |
| 4.7      | Amplificação dos elementos Box e análise de similaridade.....                    | 38        |
| 4.8      | Amplificação e sequenciamento parcial do gene <i>16S rRNA</i> .....              | 39        |
| 4.9      | Autenticação e seleção dos isolados para ensaio de eficiência em pau-rainha..... | 40        |
| 4.10     | Ensaio de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha.....                    | 41        |
| 4.11     | Amplificação e sequenciamento de genes para MLSA.....                            | 43        |
| <b>5</b> | <b>Resultados e Discussão.....</b>   | <b>45</b> |
| 5.1      | Obtenção dos nódulos e isolamento de bactérias.....                              | 45        |
| 5.2      | Caracterização fenotípica dos isolados.....                                      | 47        |
| 5.3      | Avaliação da capacidade de nodulação.....  | 49        |
| 5.4      | Análise de agrupamento a partir de Box-PCR.....                                  | 50        |
| 5.5      | Análise Filogenética do gene <i>16S rRNA</i> .....                               | 52        |
| 5.6      | Autenticação dos rizóbios selecionados na filogenia de <i>16S</i>                |           |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | <i>rRNA</i> .....   | 54        |
| 5.7      | Avaliação da FBN dos rizóbios em mudas de pau-rainha..... | 54        |
| 5.8      | Análise sequências multilocus (MLSA).....                 | 60        |
| 5.9      | Análise concatenada de sequências multilocus.....         | 67        |
| <b>6</b> | <b>Conclusões</b> .....                                   | <b>69</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                  | <b>71</b> |
|          | <b>APÊNDICE</b> .....                                     | <b>84</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição do *C. paraense* = quadrados preenchidos. Fonte: (PIRIE; KLITGAARD; PENNINGTON, 2009)..... 21
- Figura 2 Diferentes estágios de crescimento da planta pau-rainha (*C. paraense* Tul.) em condições naturais. A) sementes e sâmaras alada; B) Planta jovem de pau-rainha próximo à planta adulta; C) planta adulta de pau-rainha em fase reprodutiva..... 22
- Figura 3 Plantas de pau-rainha com 30 dias de cultivo em casa de vegetação para a obtenção dos nódulos..... 83
- Figura 4 Experimento conduzido em casa de vegetação para avaliação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos obtidos de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense*) inoculados em feijão-caupi..... 83
- Figura 5 Experimento em casa de vegetação para avaliar a eficiência dos isolados na promoção do crescimento de mudas de pau-rainha... 85
- Figura 6 Distribuição quantitativa de nódulos e isolados bacterianos obtidos de solos coletados em áreas de ilhas de mata localizadas em três municípios do Estado de Roraima..... 45
- Figura 7 Dendrograma dos 178 isolados bacterianos oriundos de nódulos de *Centrolobium paraense* gerado a partir de uma matriz binária e agrupado pelo método UPGMA. Quadrados cheios = ausência da característica; quadrados vazios = presença da característica. P1 = crescimento rápido, P2 = crescimento intermediário, P3 = crescimento lento, P4 = pH alcalino; pH ácido, P5 = colônias pequenas, P6 = colônias médias, P7 = colônias grandes, P8 = colônias circular; colônia irregular, P9 = colônia plana, P10 = colônia convexa, P11 = colônia elevada, P12 = colônia côncava, P13 = borda lisa; ondulada, P14 = pouco muco, P15 = muco moderado, P16 = muco abundante; P17 = muco transparente, P18 = muco translúcido, P19 = muco opaco, P 20= muco homogêneo; muco heterogêneo..... 87
- Figura 8 Géis de agarose mostrando fragmentos Box amplificados dos rizóbios isolados de nódulos de *C. paraense*..... 89
- Figura 9 Dendrograma formado pelo agrupamento (adotando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard) dos produtos obtidos na análise de BOX-PCR dos 36 isolados de pau-rainha (*Centrolobium paraense*) e estirpes de referência (*B. elkanii* – BR 113; *B. japonicum* – BR 114; *R. tropici* – BR 322). Quadrado marrom: Área I; Quadrado verde: Área III; Quadrado amarelo: Área IV; Quadrado Roxo: Área V; Quadrado rosa: Área VI..... 51

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 10 | Análise filogenética dos gene <i>16S rRNA</i> de 24 isolados de pau-rainha. Em destaque: isolados representativo da cada ramo filogenético utilizados para autenticação em feijão-caupi.....   | 53 |
| Figura 11 | Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha. Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estirpe eficiente (ERR 326).....  | 91 |
| Figura 12 | Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha. Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estirpe de referência BR 114 ( <i>B. japonicum</i> ).....   | 91 |
| Figura 13 | Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha. Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado;; Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estipe pouco eficiente (ERR 305).....  | 92 |
| Figura 14 | Filogenia baseada em sequências do gene <i>glnII</i> obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero <i>Bradyrhizobium</i> . A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.....  | 62 |
| Figura 15 | Filogenia baseada em sequências do gene <i>gyrB</i> obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero <i>Bradyrhizobium</i> . A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.....   | 63 |
| Figura 16 | Filogenia baseada em sequências do gene <i>rpoB</i> obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero <i>Bradyrhizobium</i> . A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.....   | 65 |
| Figura 17 | Filogenia baseada em sequências do gene <i>recA</i> obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero <i>Bradyrhizobium</i> . A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.....   | 66 |
| Figura 18 | Filogenia baseada em sequências concatenadas dos gene <i>glnII</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> e <i>recA</i> obtidas de rizóbios de pau-rainha e estirpes tipo para o gênero <i>Bradrhizobium</i> . A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições. Em destaque: grupos correlacionados com as áreas de isolamento..... | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Caracterização e localização das áreas de coleta em diferentes fitofisionomias de Roraima em áreas de ocorrência do pau-rainha ( <i>Centrolobium paraense</i> Tul.).....            | 35 |
| Tabela 2 | Composição da solução de Hoagland e Arnon com adaptação utilizada para irrigar os tratamentos do ensaio de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha.....                      | 84 |
| Tabela 3 | <i>Primers</i> utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes <i>housekeeping</i> .....  | 44 |
| Tabela 4 | Sequências de estirpes depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética dos rizóbios isolados de pau-rainha.....   | 86 |
| Tabela 5 | Avaliação de parâmetros de desenvolvimento vegetal obtidos de pau-rainha ( <i>Centrolobium paraense</i> Tul.) inoculados com rizóbios nativos em ambiente de savana de Roraima..... | 56 |
| Tabela 6 | Coeficiente de correlação entre os parâmetros utilizados para avaliação da FBN de rizóbios inoculados em pau-rainha ( <i>Centrolobium paraense</i> Tul.).....                       | 90 |

## 1 Introdução

A Amazônia é um dos mais ricos biomas do planeta e possui riquezas biológicas pouco exploradas, principalmente em se tratando de microrganismos (LOPES; NASS; MELLO, 2005; REIS; BALDANI; BALDANI, 2005). Apesar de negligenciados em programas de conservação biológica, os microrganismos exercem diversas atividades imprescindíveis para a manutenção e sobrevivência das comunidades animais e vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), podendo a extinção de certos grupos microbianos representar riscos ao equilíbrio desses ecossistemas. A produção de húmus, decomposição da matéria orgânica, produção de agentes agregantes do solo, controle biológico e ciclagem de nutrientes são algumas das atividades exercidas principalmente por bactérias e fungos.

Dentre estes processos, a ciclagem de nutrientes ganha destaque, sobretudo em ambientes com solos de baixa fertilidade natural como os da Amazônia, sendo fundamental para a manutenção de diversos ciclos biológicos, em especial, das plantas. O nitrogênio (N) representa um dos elementos mais limitantes ao crescimento das plantas e é fornecido, principalmente, pela fixação do nitrogênio atmosférico através de grupos bacterianos denominados diazotróficos, em um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Dentre estes organismos, os rizóbios constituem um dos grupos de bactérias diazotróficas que, em geral, estão associados de forma específica com plantas da família *Leguminosae*. Estas bactérias apresentam a capacidade de colonizar raízes, e excepcionalmente, caule de plantas leguminosas, através de uma série de mecanismos químicos e moleculares que culminam na formação de estruturas hipertróficas no interior do tecido vegetal, denominadas de nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Trata-se de uma relação mutualística onde as plantas são beneficiadas pelo suprimento constante de N, ao custo de fornecer parte dos carboidratos sintetizados durante a fotossíntese para a manutenção dos rizóbios.

Esta interação é particularmente importante nos estágios iniciais de desenvolvimento dessas plantas promovendo o crescimento vegetal em virtude de um aporte natural de nitrogênio. Em sistemas naturais estima-se que este processo seja responsável por adicionar cerca de 90% do nitrogênio utilizado pelos seres



vivos (SILVA et al., 2007), sendo a simbiose leguminosa-rizóbio uma das principais vias de transição entre o N molecular disposto em forma de gás N<sub>2</sub> e o N-orgânico.

Neste contexto, as espécies de leguminosas arbóreas noduladas exercem um importante papel em sistemas naturais (FRANCO; CAMPELLO, 2005), pois em geral representam benefícios ao desenvolvimento de outras plantas e a melhoria do ambiente, uma vez que são capazes de disponibilizar macronutrientes essenciais à vida como o nitrogênio (DIAS et al., 2007) e o fósforo (CHAGAS JUNIOR et al., 2010) através da formação de matéria orgânica gerada da decomposição da serapilheira.

Adicionalmente, estas plantas também exercem funções protetoras contra os efeitos erosivos sobre o solo, através da estruturação e produção de cobertura do solo (FRANCO; CAMPELLO, 2005), sendo, portanto, frequentemente estudadas em programas de reflorestamento ou recuperação de áreas degradadas (CHADA; CAMPELLO; FARIA, 2004) em virtude da agilidade em promover a sucessão vegetal.

Em Roraima, a espécie *Centrolobium paraense* Tul., conhecida popularmente como pau-rainha é uma leguminosa arbórea da sub-família *Papilionoideae*, que possui a capacidade de formar nódulos podendo se beneficiar da FBN (SOUZA; SILVA; MOREIRA, 1994). Esta planta é adaptada às condições de baixa pluviosidade e é geralmente encontrada em bordas de florestas semi-decíduas (ilhas de mata) e em florestas de transição, participando da sucessão vegetal (KAMINSKI, 2004).

Além da importância ecológica, o pau-rainha possui um alto potencial madeireiro e é frequentemente utilizado na construção de moradias indígenas, na construção de móveis, como combustível, para fins medicinais e para extração de corante (KAMINSKI, 2004; PEDREIRA, 2010). No entanto, este recurso vegetal vem sofrendo drástica redução nas populações naturais em decorrência das pressões geradas pelas ações antrópicas, como a extração indiscriminada da madeira para lenha, ocupação de áreas dentro da mata e abertura de áreas para formação de pastagem, entre outras, tendo como consequência o aumento do risco de extinção em algumas áreas mais afetadas (PIRIE; KLITGAARD; PENNINGTON, 2009). Apesar do potencial para uso em sistemas agrosilvipastoris, esta planta ainda foi muito pouco estudada, especialmente em se tratando de microsimbiontes que

propiciem um melhor desenvolvimento da planta, havendo apenas alguns poucos dados de nodulação em espécimes de Roraima em condições de viveiro (SOUZA; SILVA; MOREIRA, 1994).

O conhecimento sobre a diversidade de rizóbios associados a esta espécie de leguminosas arbórea nativa é importante, pois representa o primeiro passo para o desenvolvimento de inoculantes recomendados para o desenvolvimento de mudas, possibilitando a utilização dessa espécie em programas de recuperação de áreas nativas desmatadas de forma sustentável, com menor dispêndio em fertilizantes agrícolas e sem introduzir espécies exóticas na região.

Assim, o estudo objetivou Caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios obtidos de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) a partir de solos sob áreas florestadas das savanas de Roraima.

## 2 Referencial Teórico

### 2.1 Savanas de Roraima

As savanas de Roraima estão localizadas no extremo norte da Amazônia brasileira e fazem parte da ecorregião "Savanas da Guiana" (BARBOSA et. al., 2007). Segundo os mesmos autores, trata-se de uma área com aproximadamente 43.358 km<sup>2</sup> de extensão e representa cerca de 70% da área total de savanas que envolvem as fronteiras de Brasil, Guiana e Venezuela. Esta ecorregião contém um conjunto diversificado de fitofisionomias, formando mosaicos não-florestais (áreas abertas) e ecossistemas florestais, associados com diferentes tipos de solos, gradientes de altitude e climas.

As fitofisionomias não-florestais são caracterizadas pela presença de vegetação aberta com predominância de gramíneas (Poácea) e pequenos arbustos; enquanto que as florestais constituem a menor porção das savanas de Roraima e são representadas pelas florestas ribeirinhas (matas de galerias), florestas de altitude e florestas semi-decídua (ilhas de mata).

Esta diversificação de ecossistemas gera uma grande heterogeneidade de habitats que, em adição às condições edafoclimáticas de Roraima, com destaque para a baixa fertilidade do solo (MELO; VALE JÚNIOR; UCHÔA, 2010) e regime de chuva reduzido, é refletida na diversidade de plantas e animais (BARBOSA et. al., 2007), e provavelmente de microrganismos adaptados, até então pouco estudados. Barbosa et. al. (2007), ressaltam que sob estas condições aumentam a possibilidade de ocorrência de espécies endêmicas, o que justifica os estudos de diversidade nestes locais.

Segundo IBGE (1992), as florestas semi-decíduas são porções florestadas encontradas em meio a extensas áreas de vegetação aberta, caracterizadas pela predominância de macro ou mesofanerófitos, lianas, epífitos e é composta por 20 a 50% de árvores caducifólias. A vegetação geralmente apresenta fisiologia de plantas xerófitas e ocorre em ecorregiões com uma estação de chuvas intensas e estiagem prolongada. Estes ambientes são muito sensível às alterações antrópicas e vêm sendo constantemente afetado pelas atividades humanas. A alta frequência do fogo, o pastoreio extensivo de diferentes criações de animais, o uso não-sustentável de

recursos naturais e a recente reorganização da política local em apoiar grandes projetos de desenvolvimento agrícola nas áreas de savana estão alterando as paisagens naturais e as interações ecológicas destes ambientes (BARBOSA *et.al.*, 2007).

Segundo Melo;Vale Júnior; Uchôa (2010) a prática da queima da vegetação nativa de campos e ilhas de matas, para a construção de roças e renovação de pastagens, tem como consequência, a quebra do equilíbrio edáfico, interferindo na interação com organismos e provocando empobrecimento do solo. Nestas circunstâncias, o solo torna-se mais susceptíveis a perdas significativas da matéria orgânica e, conseqüentemente, a degradação. Segundo os mesmos autores, o manejo predatório destes sistemas reflete uma prática muito antiga e generalizada da região, que tem como consequência a redução da capacidade de suporte das terras, mesmo aquelas de melhor qualidade.

As florestas ribeirinhas ou matas ciliares representam outra fitofisionomia que também ocorre na ecorregião das savanas de Roraima, cobrindo as margens dos rios e igarapés. Esta vegetação tem uma importante função de manter a estabilidade do solo contra erosão e a assoreamento das margens dos rios, além de ter participação no ciclo hidrológico e possuir grande diversidade de plantas, animais e microrganismos (FELFILI *et al.*, 2000). Entretanto, apesar de serem protegidas por leis ambientais, estes ambientes vem sendo constantemente afetados, principalmente pela prática da agropecuária (FELFILI *et al.*, 2000) nas proximidades de corpo d'água, havendo remoção parcial desta vegetação.

Nestes ambientes degradados é imprescindível a recuperação da vegetação nativa, seja ela de forma natural, protegendo-a de futuros danos ambiental, ou em casos mais críticos, pelas intervenções antrópicas por meio de plantio de mudas nativas bem desenvolvidas. Em ambos os casos a presença de leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas tem grande importância na reabilitação de uma determinada área degradada, uma vez que estas plantas apresentam maiores chances de alcançarem a fase adulta e contribuir com incremento da matéria orgânica do solo rica em nitrogênio e fósforo orgânico. Além de criar melhores condições para a sucessão de outras plantas.

## **2.2 Uso de leguminosas arbóreas**

A família *Leguminosae* é a terceira maior família de plantas de angiospermas com cerca de 20.000 espécies distribuídas em 700 gêneros (LEWIS; SCHIRE, 2003). Ela está bem representada nos principais ecossistemas brasileiros com estimativa de haver cerca de 10% do total das espécies concentradas principalmente na Amazônia e Cerrado (FARIA et al., 1999). Registros mostram que 23% de todas as espécies descritas atualmente já foram estudadas, e que destas, 88% são espécies nodulíferas.

Muitas dessas leguminosas possuem a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias do grupo rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) exercendo importantes funções produtivas e protetoras em sistemas florestais, agroflorestais, agrosilvipastoris e em programas de recuperação de áreas degradadas (FRANCO; CAMPELLO, 2005). Por um lado, a função produtiva pode apresentar efeito direto na melhoria do ambiente através da decomposição da serapilheira produzida ou mesmo pela própria decomposição dos nódulos e raízes mortas. Este material, rico em N e P, beneficia determinados grupos de animais da região rizosférica (FRANCO; CAMPELLO, 2005; DIAS et al., 2007), bem como as espécies vegetais próximas (DIAS; SOUTO; FRANCO, 2007). Por outro lado, a função protetora pode ser observada pela redução da erosão e melhoria da estruturação e das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (FRANCO; CAMPELLO, 2005).

Essas características desejáveis dentro da interação rizóbio e leguminosa arbórea geralmente são usadas em processos de recuperação de áreas degradadas, destituídas de matéria orgânica, através de plantio de leguminosas arbóreas com capacidade de nodulação e micorrização, facilitando o processo de sucessão de espécies vegetais (CHADA; CAMPELLO; FARIA, 2004; FRANCO; CAMPELLO, 2005). Entretanto, trabalhos que visam à exploração e seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes em leguminosas associadas a espécies arbóreas são escassos na Amazônia.

Além dos benefícios ecológicos, o plantio dessas espécies vegetais pode gerar uma série de produtos e serviços de benefícios econômicos e sócio-ecológicos (MATOS; CAMPELLO; RESENDE, 2005). Na perspectiva econômica da pecuária, por exemplo, as leguminosas podem ser utilizadas para incrementar a disponibilidade de nutrientes, principalmente o N, às gramíneas pastoris em épocas

de seca, representando um estoque natural de alimento e minimizando os efeitos de estiagens prolongadas sobre o rebanho (DIAS et al., 2007). No setor agrícola, as leguminosas arbóreas podem integrar sistemas agroflorestais (SAF) visando, principalmente, o incremento dos macronutrientes N, P e K através de podas regulares e deposição de matéria orgânica sobre o solo (CUNHA et al., 2009). Este tipo de manejo é altamente recomendado para culturas praticadas em solos de baixa fertilidade natural e regiões montanhosa (JARAMILLO-BATERO et al., 2008) como para o cultivo de café (CUNHA et al., 2009).

Pelo lado social, estas plantas podem ser utilizadas como fonte de renda a partir do beneficiamento da lenha serrada, produção de carvão vegetal, produção de móveis e a artesanatos, além de possuir um aspecto paisagístico na construção de cercas ecológicas, moirões vivos (MATOS; CAMPELLO; RESENDE, 2005) e arborização de centros urbanos.

### 2.3 *Centrolobium paraense* Tul.

*Centrolobium paraense* (Leguminosae, Papilionoideae), popularmente conhecido como “pau-rainha”, é uma leguminosa arbórea nodulífera (SOUZA; SILVA; MOREIRA, 1994), cujas populações estão distribuídas desde o Panamá, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e estendendo-se até o Norte do Brasil, especificamente nos estados de Roraima (Figura 1) (PIRIE; KLITGAARD; PENNINGTON, 2009; KAMINSKI, 2004).

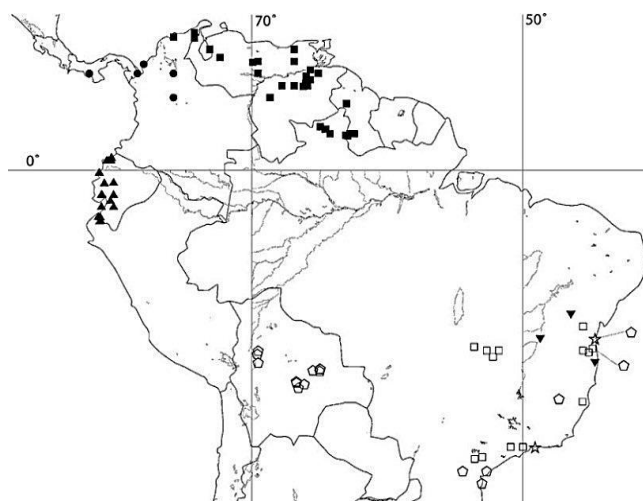


Figura 1 - Distribuição do *C. paraense* = quadrados preenchidos. Fonte: (PIRIE; KLITGAARD; PENNINGTON, 2009)

Na fase adulta, estas plantas alcançam médias entre 5-15 m de altura e tronco com 50 cm de DAP (Diâmetro na Altura do Peito), podendo ser encontrados espécimes com 30 metros de altura e com tronco com diâmetro de 120 cm, geralmente reto e cilíndrico que sustenta uma ampla copa arredondada de ramos terminais (KAMINSKI, 2004). Na fase reprodutiva, apresenta uma grande quantidade de frutos alados (sâmara) de aproximadamente 30 cm de comprimento, com uma câmara de semente recoberta por espinhos (Figura 2A) (PIRIE; KLITGAARD; PENNINGTON, 2009).



Figura 2 - Diferentes estágios de crescimento da planta pau-rainha (*C. paraense* Tul.) em condições naturais. A) sementes e sâmaras alada; B) Planta jovem de pau-rainha próximo à planta adulta; C) planta adulta de pau-rainha em fase reprodutiva.

Sendo adaptadas às condições limitantes de baixa precipitação e baixa fertilidade do solo, esta espécie está presente na maior parte da porção florestada das savanas de Roraima, e está envolvida em diversas funções ecológicas que promovem a sustentabilidade do ambiente. Como leguminosa arbórea nodulífera, sugere-se que esta planta introduza nitrogênio no sistema biológico através da FBN, e transfira parte desse nitrogênio para o solo através da deposição da liteira, especialmente quando as folhas do pau-rainha se desprendem em resposta fisiológica ao stress hídrico decorrente da estação de seca na região (KAMINSKI, 2004).

Adicionalmente, há evidências que *C. paraense* também atue na recomposição vegetal. Por ser uma espécie heliófita, *C. paraense* é uma das

primeiras espécies de porte arbóreo a se estabelecer em ambientes com maior radiação solar como as bordas das ilhas de mata ou em clareiras. Kaminski (2004) relata que plântulas e indivíduos mais jovens de pau-rainha somente foram encontrados na borda da mata ou em áreas desmatadas, indicando se tratar de uma espécie pioneira ou secundária inicial. Esta habilidade representa uma importante contribuição para o equilíbrio ecológico destes ambientes, uma vez que o desenvolvimento destas plantas proporciona condições adequadas para sucessão vegetal de outras espécies nativas, tendo implicações diretas sobre a biodiversidade local.

Além do mais, o pau-rainha possui a vantagem de ter um fruto pterocarpo, o qual é facilmente disperso pelo vento (anemocoria) e auxiliando no recrutamento de novos indivíduos em áreas mais distantes da planta matriz. Este fato, juntamente com a FBN e a sucessão vegetal, torna o pau-rainha uma espécie promissora em programas de recuperação de áreas degradadas na região, necessitando, porém, mais estudos abordando o manejo a ser empregado.

Apesar da sua importância para a manutenção da biodiversidade local, seja ela vegetal, animal ou microbiana, estes ecossistemas são constantemente pressionados por ações antrópicas, liderado principalmente pelo desmatamento para produção de pasto e atividades agrícola (VALE JÚNIOR; SCHAEFER, 2010), além alta incidência de queimadas nas savanas de Roraima. Estas ações tem por consequência uma degradação gradual do habitat do pau-rainha que, segundo Pirie; Klitgaard; Pennington, (2009), tem sofrido reduções drásticas na sua população natural. Segundo os mesmos autores, estima-se que nos próximos 10 anos haja um declínio de aproximadamente 30% das populações naturais de pau-rainha.

Outra atividade que contribui para a redução deste recurso vegetal é a extração de madeira sem a adoção de práticas de reposição nas áreas nativas ou a falta de manejo adequado. Segundo Pedreira (2010) a madeira do pau-rainha é bastante utilizada pelas comunidades indígenas, principalmente para a construção de habitações e também como lenha, tendo em vista o seu alto poder calorífico, levando assim, a escassez desta planta nas florestas no entorno dessas comunidades. Por outro lado, o setor madeireiro também as utiliza para diversos fins, os quais se destacam: a fabricação de móveis, serviços de carpintaria,



produção de vigas, caibros, escadas e pisos, construção naval, entre outros (KAMINSKI, 2004).

## 2.4 FBN em leguminosas e diversidade de rizóbios

Os rizóbios ou bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas são principalmente  $\alpha$ -protobactérias ou  $\beta$ -protobactérias gram-negativas, aeróbicas obrigatórias, sem endosporos, capazes de promover a formação de estruturas hipertróficas corticais em raízes, e excepcionalmente no caule, denominada nódulos (XAVIER et al., 2006; KOBAYASHI; BROUGHTON, 2008). Trata-se de uma relação simbiótica de protocooperação ou mutualista (KIERS; WEST; DENISON, 2008; BONTEMPS et al., 2009) onde as bactérias fornecem o nitrogênio através da atividade de um complexo enzimático denominado nitrogenase. Esta enzima é capaz de quebrar a tripla ligação entre as moléculas do gás nitrogênio ( $N_2$ ) tornando mais reativo e possibilitando a conversão para forma de amônia, a qual é facilmente assimilável pelas plantas. Em resposta a FBN, as plantas translocam açúcares sintetizados na fotossíntese até as partes radiculares, mantendo os bacteróides que se encontram no interior dos nódulos.

O estabelecimento da simbiose é um processo complexo, o qual é mediado pelo genótipo das bactérias e seus respectivos hospedeiros, envolvendo várias etapas e mecanismos celulares e moleculares entre parceiros simbióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), ainda não muito bem elucidados.

Algumas evidências indicam que o processo de nodulação inicia com o reconhecimento dos simbiossiontes através da comunicação mediada por sinais moleculares exsudados pela planta que ativam os genes de nodulação (gene *nod*) nos rizóbios. Estas moléculas são principalmente, flavonóides, chalconas, betaínas e isoflavonóides conjugados. Uma vez ativados, os genes *nod* iniciam a síntese dos fatores Nod (lipoquitiligossacarídeos) que induzem o início do processo de infecção na raiz da planta hospedeira a qual leva a formação dos nódulos (SANTOS; REIS, 2008).

A capacidade de se comunicar e reconhecer estruturas celulares das plantas e do rizóbios são fundamentais ao estabelecimento da simbiose, tendo como consequência a desenvolvimento dos nódulos de forma específica. Algumas culturas

como feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) são capazes de estabelecer simbiose com várias espécies de rizóbios (ZILLI; VILARINHO; ALVES, 2009), enquanto que espécies de leguminosas arbóreas geralmente são colonizadas por grupos mais reduzidos (FARIA et al., 2003) de bactérias, ou seja é mais frequente a especificidade hospedeira. Contudo, isto não representa uma baixa diversidade, pois uma espécie de leguminosa arbórea pode ser colonizada por várias estirpes geneticamente distintas de uma única espécie, podendo haver diferenças de eficiência na FBN entre elas.

Além dos fatores intrínsecos da nodulação, o processo pode sofrer influências dos fatores ambientais bióticos e abióticos. Do lado biológico, Jesus; Schiavo; Faria (2005) e Faria; Machado; Uchoas (2005) demonstraram que leguminosas, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbios podem estabelecer uma relação de sinergismo, onde o processo de nodulação e FBN são maximizados em resposta a uma maior disponibilidade nutrientes essenciais para inicialização e manutenção da simbiose. Por outro lado, as variáveis abióticas como, por exemplo, o pH, a umidade e matéria orgânica do solo podem influir positiva ou negativamente dependendo das variações de cada uma delas (HARA; OLIVEIRA, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No ciclo do nitrogênio a FBN representa a principal via de entrada natural de N nos sistemas biológicos. Estima-se que a fixação global de N seja de 200 milhões de toneladas por ano (BURNS; HARDY, 1975 apud GRAHAM, 2008). Destes, 25 a 90 milhões de toneladas provêm de sistemas naturais, onde não ocorre interferência do homem na introdução de bactérias fixadoras de nitrogênio. Por este fato, a FBN é considerada, depois da fotossíntese o processo biológico mais importante do planeta (HOWIESON et al., 2008).

De tal modo, o grupo rizóbio (denominação genérica a todas as bactérias nodulíferas fixadoras de N) é atualmente considerado, o mais bem estudado e importante na agricultura tropical, sendo responsável, no Brasil, pela economia de U\$ 7 bilhões em fertilizantes nitrogenados (STRALIOTTO, 2005; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007), na cultura de soja. A redução de investimentos em adubação nitrogenada, em virtude da utilização da FBN, além de fornecer benefícios econômicos ao setor agrícola, representa uma alternativa sustentável diminuindo os riscos de contaminação de recursos hídricos e a emissão de gases de efeito estufa,

como o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), que contribui significativamente para o aquecimento global (CARVALHO; ALVES; PEREIRA, 2010).

A utilização de rizóbios é amplamente recomendada para desenvolvimento de inoculantes que promovam o crescimento vegetal, sendo necessário um maior aprofundamento sobre a diversidade e a capacidade de nodulação por rizóbios em solos brasileiros, sobretudo na Amazônia, visto a sua amplitude e variedade de ambientes. Segundo Weir (2012), a capacidade de formação de nódulos em leguminosas herbáceas ou arbóreas é atribuída a 98 espécies de bactérias de 13 gêneros: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Phyllobacterium*, *Microvirgae* *Shinella*.

Apesar disso, considera-se que o número de espécies existentes ainda esteja bastante subestimado, uma vez que a maioria das espécies da família *Leguminosae* ainda não foi pesquisada quanto à capacidade de nodulação, e conseqüentemente, as características das bactérias a elas associadas também são desconhecidas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Observa-se ainda, que apesar do Brasil possuir a maior diversidade de leguminosas do mundo, com cerca de 2700 espécies, apenas três espécies de bactérias do grupo dos rizóbios foram descritas a partir de bactérias isoladas no país, sendo elas *Rhizobium tropici*, *Azorhizobium doebereineriae* e *Rhizobium leucenea* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; MOREIRA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2012). Este fato torna evidente a necessidade de explorar os mais diversos ambientes dos biomas brasileiros e as leguminosas neles presentes.

A maioria das bactérias nodulantes descritas foram isoladas a partir de espécies de leguminosas herbáceas de grande interesse agrícola, como a soja e o feijão. No entanto, as informações sobre a diversidade e eficiência de rizóbios colonizando raízes de espécies de leguminosas arbóreas, recentemente, vem ganhando destaque com a crescente demanda no desenvolvimento de alternativas para a recuperação de pastagens degradadas (DIAS; SOUTO; FRANCO, 2007) e áreas de encostas (COSTA et al., 2004).

Estes esforços contribuíram para a seleção e recomendação de aproximadamente 50 estirpes de rizóbios para 43 espécies de leguminosas arbóreas

no Brasil, havendo um predomínio de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2004).

## 2.5 Rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*

O gênero *Bradyrhizobium* se caracteriza por agrupar rizóbios que compartilham crescimento lento e a capacidade de alcalinizar meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009). Estes atributos fisiológicos-culturais foram observados por Jordan em 1982 para espécie "*Rhizobium japonicum*" a qual foi reclassificada, surgindo assim o gênero *Bradyrhizobium*.

Segundo Menna; Barcellos; Hungria, (2009) o gênero *Bradyrhizobium* estabelece simbiose com várias plantas hospedeiras herbáceas ou arbóreas, sendo encontrado em várias regiões do mundo nos mais variados climas. Apesar disso atualmente só são conhecidas 13 espécies: *Bradyrhizobium betae* (RIVAS et al. 2004), *Bradyrhizobium canariense* (VINUESA et al. 2005), *Bradyrhizobium cytisi* (CHAHBOURNE et al., 2011), *Bradyrhizobium denitrificans* (VAN BERKUM; LEIBOLD; EARDLY, 2011), *Bradyrhizobium elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992), *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* (ZHANG et al., 2012), *Bradyrhizobium iriomotense* (ISLAM et al. 2010), *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN 1982), *Bradyrhizobium jicamae* (RAMÍREZ-BAHENA et al. 2009), *Bradyrhizobium lablabi* (CHANG et al., 2011), *Bradyrhizobium liaoningense* (XU et al., 1995), *Bradyrhizobium pachyrhizi* (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2009), *Bradyrhizobium yuanmingense* (YAO et al., 2002).

Este número de espécies tende a aumentar à medida que novas técnicas baseadas em marcadores moleculares e fenotípicos vão sendo desenvolvidos e aprimoradas para aumentar a capacidade de distinção desses organismos.

De fato, novas pesquisas utilizando o sequenciamento de outros genes com maior polimorfismo que o 16S *rRNA*, que tem baixo poder de discriminação das espécies deste gênero, vem ajudando no descobrimento de novas espécies (VINUESA et al., 2005; RAMÍREZ-BAHENA et al., 2009; CHANG et al., 2011). Em 2013 duas bactérias isoladas na China apresentaram alta similaridade com o gênero *Bradyrhizobium*, porém foram divergentes com outras estirpes tipo das espécies já

descritas (WANG et al., 2013; WANG et al., 2013). Atualmente estes isolados estão em processo de validação como *Bradyrhizobium daqingense* (WANG et al., 2013) e *Bradyrhizobium arachidis* (WANG et al., 2013). Com base nos recentes trabalhos publicados sugere-se que este gênero apresenta grande variedade de espécies e estirpes ainda não descritas e outras sejam reclassificadas.

De todas as espécies de *Bradyrhizobium* atualmente descritas nenhuma foi isolada a partir de leguminosas arbóreas. Apesar disso, essas plantas apresentam uma estreita relação com espécies do gênero (MOREIRA, 1997; MENNA et al., 2006; BRASIL, 2004). Neste sentido, pesquisas que visam o conhecimento da biodiversidade de rizóbios associados a estas plantas aumentam as chances de descobertas de novas espécies do gênero, sobre tudo na Amazônia onde se encontra uma das maiores diversidade de leguminosas arbóreas do mundo, das quais poucas foram estudadas quanto à capacidade de nodulação.

Isolados deste gênero apresentam diversas habilidades úteis para o cultivo de plantas. No Brasil a participação de estirpes das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* representam um grande avanço para cultura da soja, garantindo uma alta produtividade a baixo custo de produção, devido a FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Adicionalmente outros mecanismos das bactérias podem ser acionados em decorrência das condições ambientais e nutricionais das plantas hospedeiras. Na Amazônia há vários rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* tolerantes a acidez e a toxidez por alumínio no solo (CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009a). Esta é uma característica bastante relevante para a seleção e recomendação de inoculantes para uma cultura, uma vez que acidez é a condição edáfica predominante em solos tropicais como os encontrados no Brasil. Além disso, estas bactérias ainda podem produzir fito-hormônios promotores de crescimento vegetal como o Ácido Indol-Acético (AIA) e solubilizar fosfatos fixados no solo na forma de fosfatos de cálcio ou alumínio (CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009b; CHAGAS JUNIOR et al., 2010). A combinação dessas funções pode contribuir para um incremento da simbiose entre rizóbios e leguminosas, sendo necessário conhecer os recursos genéticos microbianos existentes.

## **2.6 Métodos de caracterização de Rizóbios**

Rizóbio é um termo que se convencionou para todas as bactérias que compartilham a capacidade de induzir a formação de nódulos em leguminosas, incluindo 13 gêneros de  $\alpha$ -protobactérias ou  $\beta$ -protobactérias. Estes gêneros, por vezes, podem ser reconhecidos com base em características culturais e morfológicas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970). No entanto, estas características podem apresentar variações importantes dependendo de fatores ambientais, podendo implicar na identificação errônea de gêneros de rizóbios.

Em consequência disso, as primeiras tentativas de classificação dos rizóbios resultou em agrupamentos de organismos distintos em um único gênero. O primeiro registro dessas bactérias foi realizado por Frank em 1882 com a descrição do gênero *Rhizobium*. Jordan (1982) constatou que dentro deste gênero havia bactérias com características divergentes, com crescimento lento e alcalinização de meio de cultura, propondo assim uma readequação para formação do gênero *Bradyrhizobium*.

Essas inconstâncias na classificação demonstraram a fragilidade da taxonomia de procariotos baseada em caracteres fenotípicos, passando a ser complementada com análises genotípicas, pois são mais estáveis e remontam as relações filogenéticas, surgindo assim o conceito de caracterização polifásica (STACKEBRANDT, 2006).

A taxonomia de procarioto atual tem suas bases consolidadas com o advento das tecnologias modernas de genética e biologia molecular. O surgimento de diversos tipos de marcadores moleculares que detectam polimorfismos genéticos diretamente do DNA permitiu ampliar a capacidade dos estudos de diversidade genética inter e intra-específica (FALEIRO, 2007). As primeiras tentativas de utilização das informações do DNA foram baseadas no percentual das bases nitrogenadas do DNA G+C de diferentes bactérias. Mais tarde, verificou-se a necessidade de uma técnica mais robusta, quando surgiu a técnica de hibridização DNA-DNA, a qual é utilizada até hoje para descrição de novas espécies (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Entretanto estas técnicas se limitam apenas em diferenciar bactéria se não fornecem as relações filogenéticas.

As metodologias evoluíram, e a possibilidade de amplificação do DNA a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitou o acesso a informações contidas em genes específicos envolvidos em mecanismos celulares de forma muito

mais rápida e precisa, permitindo desvendar as relações filogenéticas entre grupos de bactérias.

Para a taxonomia de rizóbios, o gene *16S rRNA* representa o marcador molecular universal, apresentando uma ampla base de dados, o que contribuiu para comparação dos estudos de filogenia de rizóbios em todo mundo (RIVAS et al., 2009). Este gene apresenta algumas características, pelas quais foi escolhido para a filogenia de procariotos, entre estes se destacam: a ubiquidade e a constância funcional, ancestralidade comum, a estabilidade genética, tamanho apropriado, e a evolução da molécula de forma independente em diferentes domínios (STACKEBRANDT, 2006). Trata-se de um gene de aproximadamente 1600 pares de base (bp) codificante para o RNA componente da menor sub-unidade dos ribossomos dos organismos procariotos, sendo essencial para manutenção das funções vitais das células bacterianas. Em geral, o *16S rRNA* contém regiões conservadas e nove "regiões hipervariáveis" que são mais informativas para a determinação da diversidade de bactérias, ao nível de espécies (CHAKRAVORTY et al., 2007).

No entanto, estudos recentes trazem evidência que, em alguns casos, a análise filogenética por este marcador pode apresentar distorções em virtude da ocorrência de cópias múltiplas do operon de RNA ribossomal em um mesmo genoma bacteriano (ACINAS et al., 2004). Rivas et al., (2004) complementam que em rizóbios pode haver transferência lateral e recombinações gênicas que constituem limitações à filogenia baseada do *16S rRNA*. Além disso, o gene *16S rRNA* ao longo da história evolutiva se manteve bastante conservado, havendo poucos sítios variáveis, reduzindo o poder de separação entre organismos relacionados (CHANG et al., 2011; STACKEBRANDT, 2006). Para o gênero *Bradyrhizobium*, em particular, estudos constataram haver poucas informações taxonômicas restritas ao gene *16S rRNA*, sendo necessária a adição do sequenciamento do gene ribossomal 23S e/ou a região intergênica (ITS) para uma maior resolução (CHANG et al., 2011; MENNA, et al. 2009; RIVAS et al., 2009).

Alternativamente, novas abordagens taxonômicas baseadas em outros marcadores moleculares mais robustos vêm sendo utilizadas para cobrir as limitações da filogenia do gene *16S rRNA*. Genes como *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII* e *dnaK* tem ganhado destaque em estudos de taxonomia de rizóbios (CHANG et al.,

2011; RIBEIRO et al., 2009; BINDE et al., 2009; RIVAS et al., 2009). Isto porque estes genes possuem estabilidade genética, porém apresentam maiores divergências genéticas em relação ao 16S *rRNA*, mesmo entre espécies proximamente relacionadas, contribuindo assim, para construção de árvores filogenéticas bastantes consistentes entre eles (RIBEIRO et al., 2009; MENNA et al., 2009).

Estes genes foram denominados de “*housekeeping*” devido importância na manutenção das funções vitais das células bacterianas. O gene *recA* está relacionado a síntese da enzima recombinase A, a qual promove a processos de recombinação de sequências de DNA complementar e permite a troca de fragmentos de DNA; o *gyrB*, codifica para uma topoisomerase II, envolvida no desenovelamento do DNA durante a replicação do cromossomo bacteriano; o *rpoB*, é o gene responsável pela síntese de elementos essenciais na transcrição do DNA para mRNA; o *glnII* codifica para glutamina sintetase, fundamental para incorporação de nitrogênio em componentes celulares como as bases nitrogenadas do DNA.

Quando analisados de forma conjunta (análise de sequência multilocus – MLSA) detém um alto poder de resolução das relações filogenéticas. Segundo RIVAS et al.(2009) a lógica por trás da combinação de cinco genes (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII* e *dnaK*) está no nivelamento de sinais conflitantes entre as análises individuais dos mesmos, revelando agrupamentos mais coerentes. Por este motivo a MLSA é um ferramenta bastante empregadas em estudos de espécies próximas e descrição de novas espécies de rizóbios, especialmente dentro do gênero *Bradyrhizobium* (RIVAS et al., 2009; WANG et al., 2013; WANG et al., 2013).

Apesar disso, pequenas divergências genéticas encontradas entre estirpes de uma mesma espécie podem não ser detectadas a partir do sequenciamento desses genes, sendo necessário a utilização de técnicas moleculares como RAPD (Random amplified polymorphic DNA), amplificação de sequências *fingerprinting* e rep-PCR (repetitive-sequence-based-PCR) (HUNGRIA et al., 2008). O princípio dessas técnicas baseia-se na amplificação de sequências únicas em cada estirpe, análogas uma impressão digital da bactéria.

BOX-PCR é uma tipo de rep-PCR, que utiliza um único *primer* para amplificação de sequências genômicas em ambas as fitas de DNA gerando perfis de fragmentos amplificados, visíveis quando submetidos a eletroforese. Estas



sequências, geralmente se encontram no espaço intergênico e sugere-se que o elevado polimorfismo gerado esteja ligado ao processo de evolução adaptativa, mediante interação com ambiente hostil (HUNGRIA et al., 2008). Segundo os mesmos autores, esta técnica tem sido utilizada em vários trabalhos no Brasil para seleção de estirpes e controle de qualidade de inoculantes comerciais, contribuindo para obtenção de centenas de perfis de bactérias diazotróficas, incluindo os rizóbios.

### **3 Objetivo**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios obtidos de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) em Roraima.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Isolar rizóbios a partir de nódulos de pau-rainha;
- Estruturar uma coleção de culturas com os rizóbios isolados;
- Caracterizar os rizóbios simbióticos obtidos fenotipicamente e molecularmente;
- Avaliar a eficiência simbiótica dos rizóbios no desenvolvimento de mudas de pau-rainha.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Área de estudo, amostragem e processamento do solo**

Foram realizadas seis coletas de solos e sementes de pau-rainha, em propriedades particulares, durante o mês de fevereiro de 2010, sendo duas no município de Bonfim (Vila São Francisco 1 – área I e Vila São Francisco 2 – área II), duas em Normandia (Fazenda Central – área III e Fazenda Novo Destino – área IV), uma em Boa Vista (Fazenda Pau-rainha - área V) e uma em Mucajaí (Fazenda Sr. Bacabeira – área VI) (Tabela 1).

Em cada área de coleta foram retiradas cinco amostras simples de solo na profundidade de 0-20 cm, próximo de uma planta de pau-rainha adulta para compor uma amostra composta de aproximadamente 1 kg. Em seguida frações de cada amostra de solo foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Solos e Plantas da Embrapa-RR para análise de macronutrientes e matéria orgânica seguindo metodologia descrita em Embrapa (1997). O restante do solo foi destinado à análise microbiológica no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima para implantação de experimento para obtenção de nódulos.

### **4.2 Experimento para obtenção dos nódulos**

Cerca de 1 kg de cada amostra de solo coletado nas áreas de estudo foram misturados com areia lavada e autoclavada (1:1) e distribuído em três vasos de polietileno com capacidade de 2 kg (Figura 3, apêndice A). Nestes vasos foram semeadas cinco sementes de pau-rainha da mesma procedência das coletas dos solos. Após a germinação, foi realizado o desbaste, mantendo duas plantas por vaso. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, durante o período de 60 dias e as plantas foram irrigadas com água destilada sempre que necessário. Ao final do experimento as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas para coleta dos nódulos. Os nódulos coletados foram armazenados em recipientes contendo sílica-gel para posterior isolamento em meio de cultura.

**Tabela 1 - Caracterização e localização das áreas de coleta em diferentes fitofisionomias de Roraima em áreas de ocorrência do pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.)**

| Áreas de Coleta | Coordenadas Geográficas         | Fitofisionomias       | pH  | M.O (%) | Complexo sortivo                    |      |      |                     |       |                                     |                  |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------|-----|---------|-------------------------------------|------|------|---------------------|-------|-------------------------------------|------------------|
|                 |                                 |                       |     |         | cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> |      |      | mg.dm <sup>-3</sup> |       | cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> |                  |
|                 |                                 |                       |     |         | Ca                                  | Mg   | K    | Al                  | P     | SB                                  | CTC <sub>t</sub> |
| I               | 3° 25' 10.7" N; 59° 56' 17.6" W | Ilha de mata          | 5,8 | 1,95    | 1,57                                | 0,67 | 0,21 | 0,01                | 1,68  | 2,4                                 | 2,4              |
| II              | 3° 33' 22.9" N; 59° 54' 20.5" W | Ilha de mata          | 6,0 | 2,87    | 3,42                                | 0,89 | 0,26 | 0,01                | 2,96  | 4,5                                 | 4,6              |
| III             | 3° 44' 24.9" N; 59° 40' 08.7" W | Mata de galeria       | 5,1 | 2,08    | 1,69                                | 0,68 | 0,28 | 0,15                | 1,78  | 2,6                                 | 7,3              |
| IV              | 3° 45' 12.4" N; 59° 40' 26.0" W | Mata de galeria       | 5,0 | 0,71    | 1,19                                | 0,27 | 0,13 | 0,25                | 2,88  | 1,5                                 | 4,2              |
| V               | 2° 43' 39.6" N; 60° 51' 35.8" W | Ilha de mata          | 4,9 | 2,08    | 1,35                                | 1,06 | 0,15 | 0,66                | 1,68  | 2,5                                 | 8,2              |
| VI              | 2° 27' 12.9" N; 60° 54' 11.2" W | Floresta de transição | 6,0 | 2,92    | 4,92                                | 0,91 | 0,21 | 0,06                | 26,10 | 6,0                                 | 9,1              |

### 4.3 Isolamento e caracterização morfológica das bactérias

Para o isolamento das bactérias, os nódulos foram reidratados por uma hora em água destilada esterilizada, desinfestados (etanol 70 % por 3 seg.; hipoclorito de sódio a 3-5% por 5 min.; 10 lavagens sucessivas em água estéril) e macerados sobre placas de Petri contendo meio de cultura YMA acrescentado de 10 mL L<sup>-1</sup> de indicador vermelho congo a 0,25 % (FRED; WAKSMAN, 1928). As placas foram incubadas a 28°C em incubadora tipo B.O.D. por um período máximo de dez dias. As colônias crescidas foram repicadas para novas placas contendo meio de cultura YMA com indicador azul de bromotimol (5 mL L<sup>-1</sup> à 0,5%) e novamente incubadas para a purificação dos isolados.

A caracterização dos isolados purificados foi realizada após o surgimento de colônias isoladas em meio de cultura YMA com azul de bromotimol. Foi realizada a avaliação do tempo de crescimento em dias (1–3 rápido, 4-5 intermediário, 6-10 lento); pH do meio (ácido, neutro ou alcalino); diâmetro da colônia (< 2 mm pequena, 2–4 mm média, > 5 mm grande); forma da colônia (circular, irregular, puntiforme); elevação da colônia (plana, elevada, côncava, convexa, protuberante); borda da colônia (lisa, ondulada, lombada, dentada, filamentosa); superfície da colônia (lisa, rugosa); produção de muco (pouca, moderada, abundante); aparência do muco (homogêneo ou heterogêneo) e transparência do muco (transparente, translúcido e opaco). Tais características foram transformadas em dados binários e utilizadas em uma matriz de similaridade para compor uma análise de agrupamento, utilizando o métodos UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean, SNEATH; SOKAL, 1973) através do programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.6.1).

### 4.4 Estruturação da coleção de culturas

Cada bactéria isolada e caracterizada foi preservada em dois microtubos de 1,5 mL, contendo meio de cultura YMA com azul de bromotimol. As bactérias foram repicadas sobre a superfície do meio de cultura e em seguida colocadas em

incubadora tipo B.O.D. a 28°C. Após o surgimento de colônias bacterianas foi adicionado óleo mineral estéril sobre a cultura.

Os isolados também foram criopreservados através da transferência de uma porção da cultura pura à microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de meio YM suplementado com solução crioprotetora de glicerina a 20% e armazenados em freezer a -20° C.

#### **4.5 Autenticação dos rizóbios em feijão-caupi**

A partir dos perfis morfológicos bacterianos foram selecionadas 40 isolados diferentes para teste da capacidade de nodulação. Este teste foi realizado em casa de vegetação adotando-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) como hospedeiro, por se tratar de uma cultura de ciclo curto e por ser capaz de associar-se com várias espécies de bactérias nodulantes (ZILLI; VILARINHO; ÁLVES, 2008). Para cada isolado selecionado e controle não inoculado, foram preparados três vasos utilizando copos descartáveis com capacidade de 500 mL contendo substrato de areia com vermiculita (2:1) esterilizados em autoclave a 120°C por 1 h. Os vasos foram colocados sobre potes de plásticos com capacidade de 250 mL onde foram fornecida água estéril ou solução nutritiva(Figura 4 em apêndice A).

Nestes vasos, foram semeadas cinco sementes de feijão-caupi previamente desinfestadas (30 seg. em etanol 70%; 5 min. em hipoclorito de sódio a 3-5%; 10 lavagens sucessivas em água destilada estéril) em cada vaso. Procedeu-se o desbaste mantendo duas plântulas por vaso após a emergência.

Para inoculação, os isolados foram cultivados em meio YM (FRED; WASKMAN, 1928) por 72 h sob agitação de 150 rpm a 28° C. Após este período, 1 mL do inoculante foi aplicado na base de cada plântula de feijão-caupi dos respectivos tratamentos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 20 dias após a emergência (DAE), sendo irrigadas com aproximadamente 100 mL de solução nutritiva de Norris (NORRIS; T'MANNETJE, 1964) sem nitrogênio, a cada dois dias. Findo esse período, as plantas foram retiradas e as raízes lavadas para verificação da presença ou não de nódulos.

#### 4.6 Extração de DNA

Os isolados que foram capazes de nodular o feijão-caupi foram submetidos à extração de DNA no laboratório de biotecnologia da Embrapa Roraima. Os isolados foram cultivadas em meio de cultura líquido YM e incubados por 72 h sob agitação de 150 rpm a 28° C em agitador tipo shaker. Ao término deste período, uma alíquota da cultura foi transferida para microtubos de 1,5 mL para a obtenção do DNA bacteriano através do kit de extração de DNA genômico RBC<sup>®</sup> (catálogo: YGB 300) seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração do DNA foi verificado a qualidade e quantidade de material extraído através de eletroforese ajustada para 30 min a 80 V em gel de agarose 1,2% e amostras de DNA coradas com corante gel-red (Biotium<sup>™</sup>) diluído em tampão de carregamento na proporção 1:2. As amostras de DNA dos isolados foram armazenadas em freezer a - 20°C.

#### 4.7 Amplificação dos elementos Box e análise de similaridade

A amplificação dos fragmentos Box foi realizada seguindo as recomendações descritas por Hungria et al. (2008). Foram preparadas reações de PCR para o volume final de 25 µL contendo: 15 µL de água mili-Q estéril; 3 µL de dNTPs (2,5 mmol. L<sup>-1</sup> cada base); 2,5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol.L<sup>-1</sup>); 1 µL de primer BOX - 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3' (Alpha DNA<sup>™</sup>) à 12,5 pmol.µL<sup>-1</sup>; 0,5 µL de Taq polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>); e 1 µL de DNA bacteriano. Estas reações foram amplificadas em termociclador Mastercycler gradient<sup>®</sup> (Eppendorf<sup>™</sup>) ajustado em 1 ciclo de desnaturação de 95°C por 7 min.; 35 ciclos de desnaturação (1 min. a 94°C), anelamento (1 min. a 53°C) e extensão (8 min. a 72°C); 1 ciclo extensão final a 72°C por 16 min.; e manutenção a 4°C. Em seguida, as amostras foram concentradas ao volume aproximado de 5 µL em concentrador de DNA Centrivap DNA concentrator<sup>®</sup> (Labconco<sup>™</sup>).

As amostras concentradas foram então misturadas a 8 µL de corante gel-red (Biotium<sup>™</sup>) e a separação dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose ultra pura (Invitrogen<sup>™</sup>) a 2 % diluído em tampão

TBE 1 x (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL EDTA dissódio; pH 8,0 em 1 L de água destilada). O marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen™) (60% de tampão de carregamento; 14% de marcador; 26% de água ultra pura) foi aplicado nas canaletas das extremidades do gel e na central, seguido das amostras dos isolados de pau-rainha, estirpes padrões *Bradyrhizobium elkanii* (BR-113), *Bradyrhizobium japonicum* (BR-114) e *Rhizobium tropici* (BR-322) e controle negativo. A eletroforese foi executada em aproximadamente 6 h a 120 V e as imagens foram registradas através do fotodocumentador EC3 imaging System (UVP™).

Os perfis polimórficos obtidos a partir da amplificação dos elementos Box foram submetidos à análise de agrupamento realizado pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.6.1) adotando o coeficiente de Jaccard (JACCARD,1912) e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, SNEATH; SOKAL, 1973).

#### 4.8 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a amplificação do gene 16S rRNA cada reação de PCR de 50 µL foi composta de 37,5 µL de água mili-Q estéril; 1 µL de dNTPs (2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de cada base); 5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol.L<sup>-1</sup>); 1 µL dos primer Y1 - 5' TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC 3' e B3 5' TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGCT 3' à 12,5 pmol.µL<sup>-1</sup>; 0,4 µL Taq (5 U.µL<sup>-1</sup>, Invitrogen™); e 2 µL de DNA bacteriano. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador Mastercycler gradient® (Eppendorf™) ajustado para 1 ciclo de desnaturação de 95° C por 2 min.; 35 ciclos de desnaturação (2 min. a 93° C), anelamento (1 min. a 62° C) e extensão (2 min. a 72° C); um ciclo de extensão final a 72° por 5 min.; e manutenção a 4° C.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2 % por 1 h a 80 V e os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando o kit Invisorb fragment clean up (250)® (Invitek™) seguindo protocolo estipulado pelo fabricante. As amostras foram novamente submetidas à eletroforese para verificação



da qualidade dos fragmentos e desidratadas a partir da centrifugação a vácuo utilizando o equipamento Centrivap DNA concentrator<sup>®</sup> (Labconco<sup>™</sup>).

O sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* foi realizado a partir do produto de PCR utilizando o iniciador Y1, sendo a corrida realizada em sequenciador 3730xl (Applied Biosystems<sup>™</sup>). As sequências foram submetidas à ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para verificar a identidade das sequências dos rizóbios de pau-rainha com as depositadas no GenBank. Adicionalmente, foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências a partir da ferramenta ClustalW do programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011) e para as construções das árvores filogenéticas adotou-se o método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter realizando 1000 repetições (bootstrap).

#### **4.9 Autenticação e seleção dos isolados para ensaio de eficiência em pau-rainha**

A partir da filogenia do gene *16S rRNA*, foram selecionados isolados representativos de cada ramo da árvore filogenética para uma nova autenticação em feijão-caupi.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituído por 16 tratamentos com três repetições cada. Para os tratamentos inoculados foram utilizadas 11 isolados de pau-rainha (ERR 308, ERR 309, ERR 314, ERR 350, ERR361, ERR 376, ERR 377, ERR 378, ERR 399, ERR 435 e ERR 469) e três com estirpe referência (BR 113, BR 114 e BR 3262). Ainda foi incluído um tratamento com nitrogênio mineral (30 mg de N na forma de nitrato de amônia) e um tratamento controle.

As sementes de feijão-caupi foram pré-germinadas em placa de Petri contendo papel de germinação e algodão, umedecidos e estéreis. As sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar, onde realizou-se o transplante para um sistema de cultivo composto por uma garrafa de aproximadamente 350 mL contendo duas fitas de papel de germinação presas ao gargalo e submersa em solução nutritiva em Hoagland; Arnon (1950)  $\frac{1}{4}$  de força estéril (tabela 2 em apêndice B). Em seguida as sementes foram inoculadas aplicando 1 mL meio de cultura YM contendo os isolados crescidos por 96 h.

O experimento foi finalizado aos 21 DAE e a capacidade nodulífera foi atribuída aos isolados que apresentaram resultados em pelo menos uma das repetições. Os isolados que proporcionaram a formação de nódulos em feijão-caupi credenciaram os demais isolados semelhantes, pela filogenia do gene *16S rRNA*, ao teste de eficiência em pau-rainha. Os isolados que agruparam-se próximos a uma espécie reconhecidamente nodulífera também foram selecionados.

#### **4.10 Ensaio de eficiência dos rizóbios em mudas de Pau-rainha.**

O experimento foi conduzido sob condições controladas de temperatura (28°C) e luminosidade (cortina reflexiva com 50% de sobreamento) em casa de vegetação na Embrapa Roraima, adotando o delineamento inteiramente casualizado seguindo metodologia descrita em Faria; Franco (2002) com adaptações.

Os vasos foram preparados com substrato de areia e vermiculita 2:1 esterilizado por duas vezes (0 e 24 h) em autoclave a 120 ° C por 1 h. Foram utilizadas sementes de pau-rainha da área V. Estas foram escarificadas com solução de ácido sulfúrico, desinfestadas com peróxidos de hidrogênio a 5% por 5 min e pré-germinadas em placas de Petri contendo algodão umedecido e papel filtro esterilizados. Cinco dias após a germinação, as sementes com radícula de aproximadamente 1 cm de comprimento foram levadas a casa de vegetação sendo transplantadas cinco sementes nos substratos de cada vaso (Figura 5, apêndice C).

A inoculação das sementes foi realizada no momento do transplante aplicando-se 1 mL  $\text{plantula}^{-1}$  do inoculante, preparado conforme descrito anteriormente para os isolados de rizóbios selecionados e estirpes rizóbios padrões.

O experimento contou com 23 tratamentos cada um com 4 repetições. Os 18 tratamentos inoculados com isolados de pau-rainha (ERR 298; ERR299; ERR305; ERR 308, ERR 309; ERR 314; ERR 326; ERR 329; ERR 344,ERR 377; ERR 380; ERR 396; ERR 399; ERR 412; ERR 417; ERR 421; ERR 430; ERR 435) foram selecionados conforme o item 4.9. Ainda foram incluídos três tratamentos inoculados com estirpes padrões de *Bradyrhizobium* (BR 3262; BR 113; BR 114), um tratamento com adubação nitrogenada (10 mg de N  $\text{semana}^{-1}$  dos 0-28 dias; 15 mg de N  $\text{semana}^{-1}$  dos 29-70 dias; 20 mg de N  $\text{semana}^{-1}$  dos 71-77 dias; 30 mg de N  $\text{semana}^{-1}$  dos 78-91 dias) e um tratamento sem inoculação e cultivadas sem nitrogênio.

O experimento foi irrigado com solução nutritiva estéril de Hoagland; Arnon (1950) com adaptações (tabela 2 em apêndice B). Para cada tratamento foi aplicado 800 mL semana<sup>-1</sup> de solução nutritiva sobre o substrato, iniciando com a concentração mais diluída (¼ força) durante o período de 42 dias, aumentando para ½ força durante 35 dias e posteriormente para 1 força até o término do experimento. A solução nutritiva para o tratamento nitrogenado foi preparada e após a autoclavagem adicionando-se N na forma de nitrato de amônia para fornecer as concentrações descritas anteriormente.

A efetividade da inoculação em cada tratamento foi verificada desmontando-se uma repetição. Os vasos foram retirados da casa de vegetação e as raízes lavadas para visualizar a presença ou não dos nódulos aos 60 DAE.

Aos 100 DAE, foram coletados dados de crescimento e desenvolvimento das plantas de pau-rainha para determinar a eficiência dos isolados. Para cada repetição foi calculada a média das duas plantas para avaliar os seguintes variáveis: altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), área foliar (AF), número de folíolos (NF), massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total (NT), massa seca de raízes (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca dos nódulos (MSN).

A altura das plantas e o diâmetro do caule foram medidos utilizando uma régua e paquímetro digital, respectivamente. As medidas de altura foram realizadas a partir da base do caule até o meristema apical, enquanto que o diâmetro do caule foi obtido a 5 cm da base do caule.

Em seguida, a parte aérea das plantas foram separadas e utilizadas para análise de área foliar, número de folíolos, matéria seca da parte aérea e nitrogênio total. Os folíolos de cada planta foram destacados e escaneados utilizando medidor de área foliar LI – 3100 AREA METER<sup>®</sup> (LI-COR<sup>™</sup>). As amostras foram submetidas à secagem durante sete dias em estufa de circulação de ar, ajustada à 60°C. Posteriormente, estes materiais foram pesados, triturados e analisados quanto ao teor de nitrogênio utilizando o método de Kjeldahl (LIAO, 1981).

A partir das raízes, foram coletados os nódulos, que por sua vez, foram contados e submetidos à secagem em estufa de circulação de ar à 60° C por dois dias. Os nódulos desidratados foram retirados da estufa e após 1 h realizou-se a determinação da massa seca em balança analítica. Do mesmo modo as raízes foram secas e pesadas para obtenção da variável massa da matéria seca de raiz.

Os dados obtidos no ensaio de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e a comparação das médias realizada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2011).

Adicionalmente foi calculado o coeficiente de correlação entre as variáveis avaliadas.

#### 4.11 Amplificação e sequenciamento de genes *housekeeping*

A análise de sequências multilocus (MLSA) é uma técnica recomendada para distinguir espécies dentro um mesmo gênero. Neste sentido, apenas os isolados pertencentes ao mesmo gênero que os isolados que se destacaram no teste de eficiência da FBN em pau-rainha foram selecionadas para MLSA.

Para isto, amostra de DNA de cada isolado foi amplificada para os genes *recA*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e *dnaK* de acordo com metodologia descrita em Ribeiro et al. (2009) e Delamuta et al. (2012). Para cada gene amplificado foram preparadas reações de 50  $\mu\text{L}$  contendo: 37,3  $\mu\text{L}$  de água mili-Q estéril; 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de cada base); 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ); 1,5  $\mu\text{L}$  de cada primer “forward” e “reverse” à 12,5  $\text{pmol.}\mu\text{L}^{-1}$  (tabela 3); 0,2  $\mu\text{L}$  Taq polimerase (5  $\text{U.}\mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen™); e 2  $\mu\text{L}$  de DNA bacteriano.

Todas as reações foram amplificadas em termociclador Mastercycler gradient® (Eppendorf™) programado para a realização de 1 ciclo de desnaturação inicial à 95°C por 2 min.; seguido de 35 ciclos de desnaturação (45 seg. a 94°C), anelamento (45 seg. a 55°C) e extensão (2 min. a 72°C); um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min.; e manutenção a 4°C.

As amostras foram coradas com gel-red (Biotium™) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2 % por 1h à 80V para verificação da amplificação dos genes. Em seguida os produtos de PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit® (Quiagen™) e posteriormente desidratados utilizando a centrifuga Centrivap DNA concentrator® (Labconco™).

**Tabela 3 - Primers utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes *housekeeping*.**

| Genes        | Primers   | Sequências dos primers (5'–3') | Referências              |
|--------------|-----------|--------------------------------|--------------------------|
| <i>recA</i>  | TSrecAf   | CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG    | Stepkowski et al. (2005) |
|              | TSrecAr   | CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG      |                          |
| <i>glnII</i> | TSglnIIlf | AAGCTCGACTACATCTGGCTCGACGG     | Stepkowski et al. (2005) |
|              | TSglnIIlr | SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCTG        |                          |
| <i>rpoB</i>  | rpoB83F   | CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC         | Martens et al. (2008)    |
|              | rpoB1061R | AGCGTGTTGCGGATATAGGCG          |                          |
| <i>gyrB</i>  | gyrB343F  | TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG        | Martens et al. (2008)    |
|              | gyrB1043R | AGCTTGTCTTSGTCTGCG             |                          |
| <i>dnaK</i>  | BRRNAKf   | TTCGACATCGACGCSAACGG           | Martens et al. (2008)    |
|              | BRRNAKr   | GCCTGCTGCKTGATACATGGC          |                          |

Do mesmo modo que o *16S rRNA* o sequenciamento das amostras foi realizado através de reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos “forward” listados na tabela 3 e corrida em sequenciador 3730xl (Applied Biosystems™).

As sequências dos genes *housekeeping* foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas individuais e concatenada. Para fins de comparação, foram incluídas nas árvores 15 sequências de estirpes tipo de espécies diferentes do gênero *Bradyrhizobium* (tabela 4 em apêndice D). As polarizações das árvores filogenéticas foram realizadas com a estirpe LMG 14904 da espécie *Rhizobium leguminosarum*.

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado a partir da ferramenta ClustalW do programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011) e, para construção das árvores filogenéticas de cada gene adotou-se o método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Obtenção dos nódulos e isolamento das bactérias

A utilização de plântulas de pau-rainha como “planta isca” mostrou-se eficiente para a obtenção de nódulos de rizóbios nativos de solos de ilhas de mata, florestas de transição e mata de galeria de Roraima, resultando na formação de 334 nódulos com características esféricas e de coloração marrom, como descrito em Souza; Silva; Moreira (1994). Destes nódulos foram isoladas 178 bactérias, sendo que 41 foram isoladas a partir dos solos das Áreas I e Área II da vila São Francisco localizadas em ilhas de mata do município de Bonfim, 63 em Normandia nas propriedades Fazenda Central (Área III) e Fazenda Novo Destino (Área IV), 10 em Boa Vista na propriedade Fazenda Pau-Rainha (Área V) e 64 em Mucajaí na propriedade Fazenda Sr Bacabeira (Área VI) (figura 6).

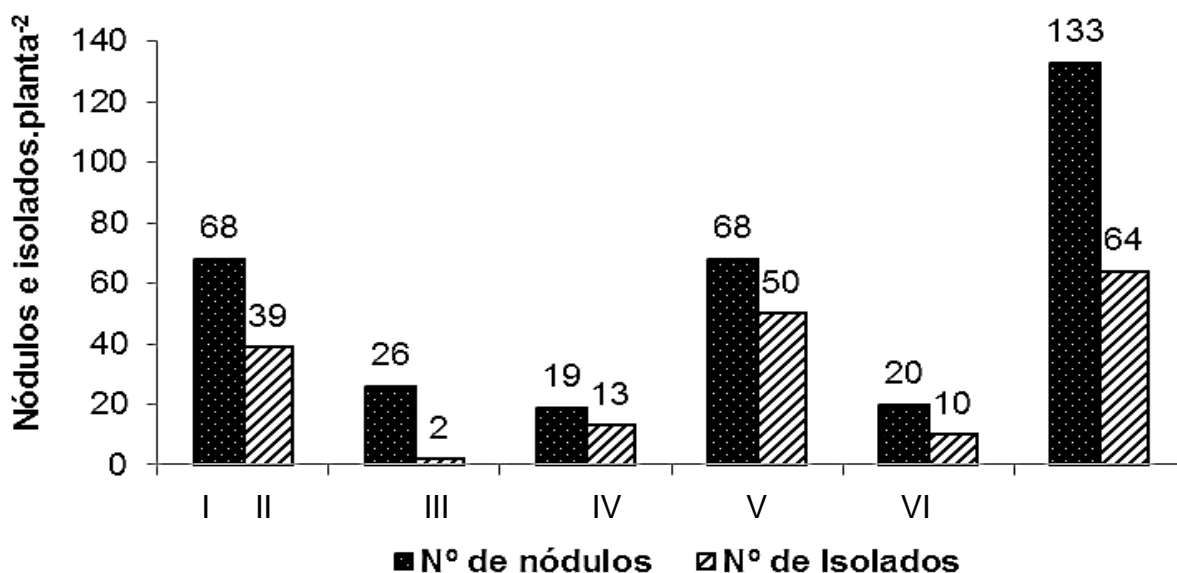


Figura 6 - Distribuição quantitativa de nódulos e isolados bacterianos obtidos de solos coletados em áreas de ilhas de mata localizadas em três municípios do Estado de Roraima.

Avaliando individualmente o número de nódulos obtidos em cada área, pode-se observar uma grande variação entre as amostras de solo, ainda que coletados no mesmo município. Entre os solos coletados no município de Bonfim, a

área I obteve 2,6 vezes mais nódulos que a área II. Por outro lado, a área III do município de Normandia gerou 357% menos nódulos em relação à área IV.

O solo que proporcionou a maior nodulação foi o coletado solo de mata de transição do município de Mucajaí com a formação de 133 nódulos, sendo este quantitativo cerca de 2 vezes maior que as áreas I e IV, 5 vezes em relação área II, 6 vezes da área V e 7 vezes quando comparada com a área III (Figura 6).

Esta discrepância entre as frequências dos nódulos em raízes de pau-rainha nas áreas indica que possivelmente fatores edáficos como o pH, a fertilidade, presença de matéria orgânica, umidade do solo, ou mesmo a presença de outros microrganismos poderiam estar influenciando a nodulação das plantas. Barberi et al. (1998) relatam que a nodulação em uma espécie nodulífera pode ser ocasionada em resposta a fatores físicos, químicos, biológicos e até mesmo ao estágio de desenvolvimento da planta. Dentre os fatores biológicos, os fungos micorrízicos arbusculares são elementos importantes a ser considerados. Algumas leguminosas arbóreas só estão aptas à nodulação quando na presença desses fungos (FARIA; MACHADO; UCHOAS, 2005), enquanto que para outras espécies a presença de FMA é facultativa, porém contribuem bastante para uma abundante nodulação (PAGANO, 2008).

A análise química dos solos coletados revelou uma baixa acidez, e, elevados valores de saturação por base e matéria orgânica (Tabela 1). De um modo geral, estes resultados encontram-se acima da média para a região, e sugere-se que nestas áreas possa haver a ocorrência de manchas de solos de melhor qualidade química, influenciada por material de origem, propiciando o surgimento de uma vegetação mais complexa de maior exigência nutricional, como as que ocorrem em ilhas de mata das savanas de Roraima. Este fato foi relatado por Vale Júnior et al., (2010) para uma zona de transição entre savana e floresta da região da Colônia do Taino, município de Alto Alegre, onde foi contatado a com a ocorrência de manchas de Latossolo Vermelho distrófico originário de rochas vulcânicas básicas (Basalto/Diabásico), resultando em valores de saturação por base acima de 80%, com predomínio de cátions de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , e baixa concentração de  $\text{Al}^{3+}$  trocável, sendo considerado de boa aptidão agrícola.

O pH da área VI apresentou-se pouco superior aos demais solos amostrados, assim como os teores de Ca, P e percentual de matéria orgânica,

podendo estes elementos terem contribuído para uma melhor condições para a nodulação, seja pelo efeito direto dos nutrientes ou pelo aumento da biomassa microbiana, incluídos os rizóbios nativos. Segundo Gomes et al. (2002) o Ca pode propiciar incremento do número de nódulos, quando obtida concentração ótima próxima de  $4,8 \text{ cmol}_c.\text{dm}^3$ . Este resultado coincide com a concentração de Ca encontrada no solo da Área VI, podendo este fator ter influenciado para a maior nodulação nesta área (tabela 1). O Ca é a primeira forma de ligação fraca entre os pêlos radiculares e a proteína ricasina presente na maioria dos rizóbios (SANTOS; REIS, 2008). Krolow et al. (2004) também demonstraram a contribuição do P no aumento do número de nódulos e incremento no peso seco de nódulos.

Após o isolamento de todos os nódulos verificou-se uma baixa relação entre nódulos e isolados obtidos. Também notou-se a presença de muitos nódulos jovens (< 1mm e coloração esbranquiçada), os quais, teoricamente, proporcionariam menor quantidade de inóculos para o cultivo em meios de cultura. Ribeiro; Rumjanek (2004) avaliaram a aplicação do método de ELISA indireto para determinação da taxa de estabelecimento de inoculante rizobiano a partir de extratos de nódulos de leguminosas, e notaram que os nódulos grandes (> 1 mm) apresentaram maior intensidade na reação de ELISA que os menores (< 1 mm), e atribuíram este fato a maior concentração de bacteróides (forma modificada dos rizóbios no interior dos nódulos sem a capacidade de se multiplicar).

## 5.2 Caracterização fenotípica dos isolados

A partir da caracterização fenotípica das bactérias foi gerado um dendrograma de similaridade onde foi possível constatar a formação de nove grupos considerando similaridade de aproximadamente 50% (Figura 7, apêndice E). Dentre estes, o grupo 5 destacou-se pela homogeneidade e por incluir a maioria dos isolados das áreas I, IV, V e VI, obtendo o percentual de inclusão de 87,2%, 80%, 100% e 100%, respectivamente. O grupo foi formado por 151 bactérias contendo 10 perfis que compartilharam características como crescimento lento, alcalinização do meio de cultura, colônia pequena, circular, plana e lisa, pouca a moderada produção de muco de aspecto opaco e homogêneo, compatíveis com gênero *Bradyrhizobium*.



Por outro lado, a maioria dos isolados bacterianos das áreas II e III agruparam-se nos grupos 1, 2, 3, 6 e 9 apresentando características predominantemente de crescimento rápido ou intermediário. As estirpes tipo de *Bradyrhizobium elkanii* (BR 113), *B. japonicum* (BR 114) e *Rhizobium. tropici* (BR 322) formaram grupos independentes sendo que apenas o isolado ERR 472 agrupou-se com BR 322.

As amostras de solo coletadas nas áreas VI e III tiveram maior riqueza de espécies de rizóbio associados à *C. paraense*, apresentando isolados distribuídos em cinco grupos cada.

De modo geral, foi constatada uma predominância de estirpes fenotipicamente semelhantes ao gênero *Bradyrhizobium*, representando 85 % do total de isolados. Os resultados corroboram com vários outros trabalhos com leguminosas arbóreas da Amazônia e mata Atlântica (STAMFORD et al., 1996; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; BARBERI et al., 1998), os quais destacam uma forte relação entre estas espécies vegetais e rizóbios pertencente ao gênero *Bradyrhizobium*. Moreira; Siqueira (2006) sugerem que as altas concentrações de  $Al^{3+}$  em solos tropicais e a tolerância à toxidez por este elemento, talvez sejam os principais fatores de seleção de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* se mantenham em alta densidade natural, e por isso estejam mais aptas a induzir nodulação natural em leguminosas nativas destas regiões.

Barbieri et al. (2004), Hara; Oliveira (2004) destacam que a capacidade de tolerar solos ácidos com níveis elevados de  $Al^{3+}$  é uma característica muito importante para a seleção de rizóbios e produção de inoculantes mais eficientes para leguminosas das regiões tropicais e subtropicais, e que esta habilidade estaria correlacionada à liberação de exopolissacarídeos por estas bactérias. Apesar disso, neste estudo as bactérias não foram submetidas aos testes de tolerância a acidez e toxidez por alumínio, podendo ser avaliada tais características nos próximos estudos.

Os demais isolados foram caracterizadas como estirpes de crescimento intermediário, alcalinizantes do meio de cultura, colônias brancas e pouca produção de muco, características do gênero *Azorhizobium*; e estirpes com crescimento rápido e acidificantes, características dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Mesorhizobium*. Bactérias com estas características também foram encontradas por

Pagano (2008), ao isolar 75 rizóbios de *Centrolobium tomentosum*, sendo que a maioria foi representada por rizóbios de crescimento rápido, contrastando com os resultados encontrados neste estudo. Segundo o mesmo autor, a ocorrência de rizóbios de crescimento rápido estaria correlacionada aos locais florestados com distúrbios ambientais (aumento da temperatura, radiação e maior decomposição MOS), enquanto que os de crescimento lentos dominariam locais mais preservados. Este evento também foi evidenciado por Stamford et al. (1996) que demonstraram a predominância de 90% de rizóbios de crescimento rápido em áreas semi-áridas, enquanto que em áreas de mata os rizóbios de crescimento lento prevaleciam em 100%.

### 5.3 Avaliação da capacidade de nodulação

Entre os grupos fenotípicos obtidos, 40 isolados foram selecionadas para avaliação da capacidade de nodulação, quando se observou que apenas quatro destas bactérias não apresentaram nodulação. Isso é um indicativo de que estes isolados não pertençam ao grupo dos rizóbios ou não estabelecem simbiose com esta espécie de leguminosa, sendo necessária a realização da inoculação destes isolados em plântulas de pau-rainha para confirmação desta hipótese ou a utilização de marcadores moleculares de genes expressos durante o processo de nodulação como *nod*, *nol* e *noe* (SANTOS; REIS, 2008).

Além disso, a utilização do feijão-caupi para avaliar a nodulação de rizóbios isolados de pau-rainha mostrou-se bastante eficiente e ágil com relação ao hospedeiro original, sendo possível verificar a formação de nódulos após 21 DAE. Considerando que algumas leguminosas arbóreas, como pau-rainha, necessitam de um tempo maior para o surgimento de nódulos, por volta de 45 a 60 dias, a agilidade em verificar a capacidade de nodulação é um requisito bastante desejável para estruturação de uma coleção de rizóbios ampla e que abranja uma maior diversidade, sobretudo quando se obtém grande número de isolados fenotipicamente distintos.

#### 5.4 Análise de agrupamento a partir de Box-PCR

Os 36 isolados capazes de induzir a nodulação em feijão-caupi tiveram seus DNAs extraídos e foram submetidas à amplificação com iniciadores para elementos BOX (Figura 8, apêndice F), gerando perfis polimórficos em gel de agarose contendo entre 5 e 17 bandas. Este grande polimorfismo de bandas geradas entre os isolados analisados demonstram que a técnica de BOX-PCR é uma ferramenta bastante apropriada para selecionar organismos geneticamente distintos, concordando com o trabalho de Hungria et al. (2008).

A análise dos perfis de fragmentos amplificados foi possível obter a formação de 21 grupos divergentes (45% de similaridade). Os grupos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 15 foram compostos de dois a seis isolados com baixa similaridade entre eles, com exceção dos isolados ERR 417 e ERR 408 que apresentaram o mesmo padrão polimórfico, e, portanto constituem a mesma estirpe bacteriana. Os demais grupos constituíram ramos monofiléticos formados a partir de isolados das áreas I, III, IV e VI (Figura9).

A área I apresentou maior número de isolados diferentes genotipicamente com 11 rizóbios distribuídos em seis grupos e dois ramos formados por um isolado, seguido da área IV com 9 isolados em sete grupos, área III com 5 isolados em cinco grupos, área VI com 6 isolados em 2 grupos e área V com 3 isolados em um único grupo. Estes dados demonstram que o pau-rainha é capaz de associar-se com várias estirpes e espécies diferentes de rizóbios nativos dos solos de Roraima. Estes resultados já eram esperados, uma vez os isolados utilizados na análise de BOX-PCR foram selecionados com base nas divergências fenotípicas de seis áreas distantes entre si e com características ambientais particulares. Segundo Hungria et al. (2008) supõe-se que os perfis polimórficos podem variar de acordo com as pressões evolutivas exercida em cada ambientes.

A alta diversidade de microrganismos é extremamente desejável com indicador da qualidade ambiental do solo. Porém, segundo Pereira et al. (2007), nem sempre há uma correlação com a obtenção de rizóbios de maior eficiência naFBN. A simbiose entre hospedeiros específicos e rizóbios nativos em geral refletem em menor diversidade e seleciona estirpes mais eficientes, a fim de garantir o fornecimento adequado de N via FBN. No entanto, esta relação entre hospedeiro e

rizóbios nativos em condições naturais precisa ser mais bem elucidada, principalmente na Amazônia cujas pesquisas neste sentido ainda são bastante reduzidas e a compreensão do comportamento da FBN em espécies de leguminosas arbóreas como a *C. paraense* ainda são incipientes.

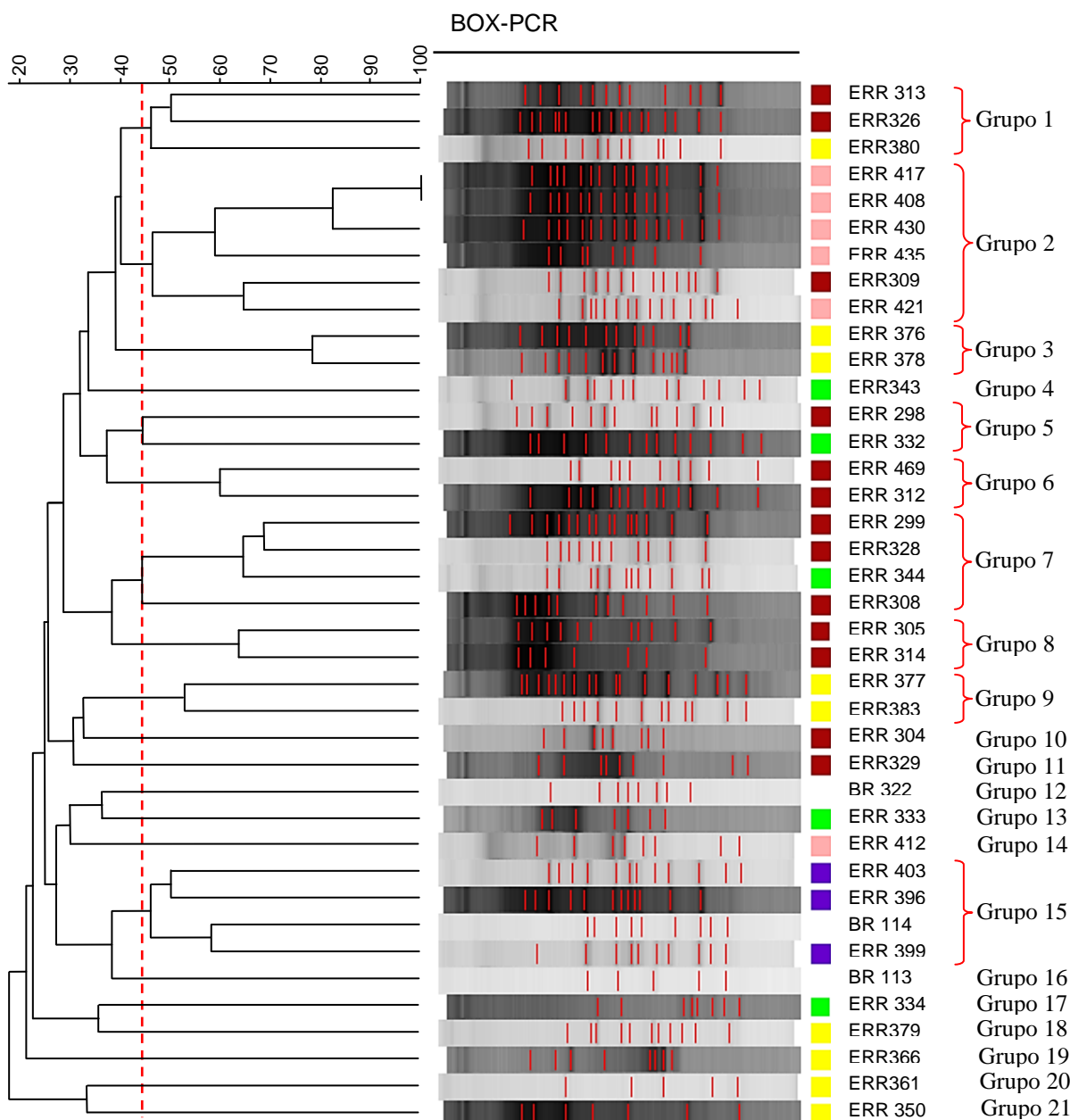


Figura 9 - Dendrograma formado pelo agrupamento (adotando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard) dos produtos obtidos na análise de BOX-PCR dos 36 isolados de pau-rainha (*C. paraense*) e estirpes de referência (*B. elkanii* – BR 113; *B. japonicum* – BR 114; *R. tropici* – BR 322). Quadrado marrom: Área I; Quadrado verde: Área III; Quadrado amarelo: Área IV; Quadrado Roxo: Área V; Quadrado rosa: Área VI.

Outra informação relevante refere-se à formação de grupos com predominância de rizóbios isolados de uma mesma área. Nos grupos 1, 6, 7 e 8 houve uma preponderância de rizóbios da área I; os grupos 3 e 9 foram constituídos exclusivamente por bactérias da área IV; e os grupos 2 e 15 prevaleceram os rizóbios isolados das áreas VI e V, respectivamente, sendo que o grupo 15 também incluiu a estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum* BR 114 (figura 9). Com estes resultados sugere-se que para cada área de coleta exista uma preferência por determinados grupo de rizóbio, podendo esta seleção ser ocasionada em função do genótipo de pau-rainha, bem como pela capacidade competitiva das bactérias frente à população local de rizóbios.

### 5.5 Análise Filogenética do gene 16S rRNA

Após o sequenciamento das amostras verificou-se que 11 isolados (ERR 304, ERR 313, ERR 328, ERR 332, ERR 334, ERR 343, ERR 379, ERR 378, ERR 383, ERR 403 e ERR 408) apresentaram baixa qualidade das sequências ou possuíam fragmentos menores que 250 bp, impossibilitando a análise destes.

Com a análise comparativa do BLASTn contatou-se que dezoito isolados apresentaram alta identidade (99-100% de identidade) com o gêneros reconhecidamente nodulíferos, sendo quatorze pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, dois ao gênero *Rhizobium* e dois ao gênero *Burkholderia*. As oito sequências restantes foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pleomorphomonas*, *Acidisoma*, e gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Estes dados confirmam a predominância de rizóbios pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* demonstrado anteriormente nos resultados de caracterização fenotípica.

Quando as sequências foram alinhadas juntamente com estirpes tipo de cada gênero, obteve-se 300 sítios para a análise filogenética, dos quais 196 mostraram-se conservados. Pouco mais de um terço (104) representavam sítios variáveis e proporcionaram a formação de seis grupos compostos por bactérias de gêneros diferentes. Este resultado demonstra que o gene 16S rRNA representa uma ferramenta bastante útil para estudos taxonômicos, corroborando com Toledo; Marcondes; Lemos (2009). Entretanto, este marcador molecular não foi capaz de

revelar as divergências inter-específicas dentro de cada grupo, principalmente para os isolados pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*(figura 10) como contatado por Chang et al. (2011) e Delamuta et al. (2012).

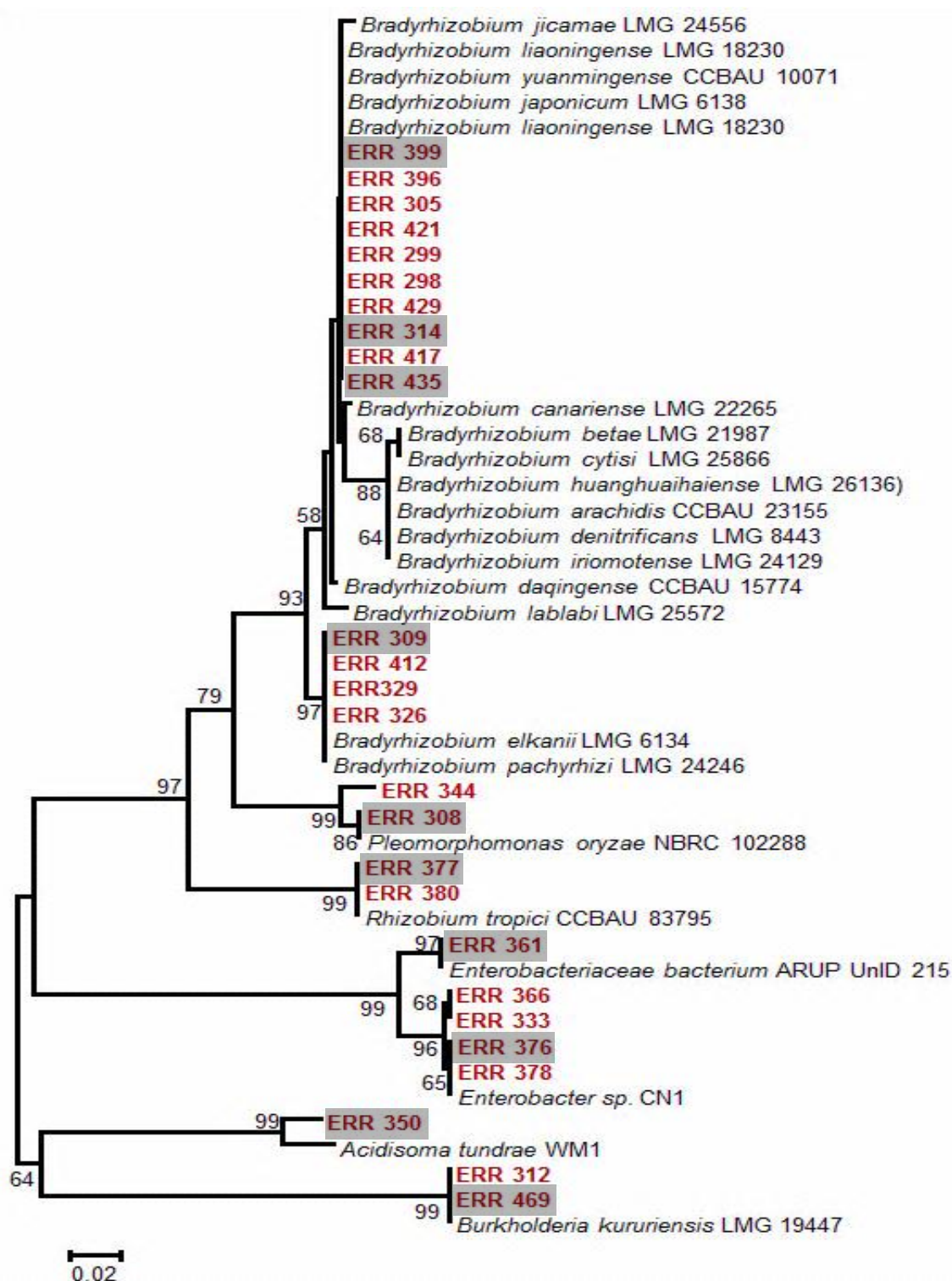


Figura 10 - Análise filogenética dos gene *16S rRNA* de 24 isolados de pau-rainha. Em destaque: isolados representativo da cada ramo filogenético utilizados para autenticação em feijão caupi.

Neste trabalho, a limitação do 16S *rRNA* em separar os diferentes táxons pode ser atribuída a baixa taxa de variação nas sequências analisadas (3,4%) e ao pequeno fragmento obtido após alinhamento das sequências, podendo ter ocorrido a exclusão de regiões hipervariáveis, as quais são mais informativas para diferenciação de rizóbios. Segundo Chakravorty et al. (2007) o 16S *rRNA* contém nove "regiões hipervariáveis", oito regiões conservadas sendo estas últimas utilizadas para o anelamento dos *primers*, pois apresentam poucas variações.

## 5.6 Autenticação dos isolados selecionado

Todos os isolados identificados como *Bradyrhizobium* foram capazes de induzir a nodulação em feijão-caupi, sendo selecionados para o teste de eficiência em pau-rainha.

O isolado ERR 308 agrupado juntamente com a estirpe tipo de *Pleomorphomanas orizae* promoveu nodulação em apenas em uma das repetições. No entanto este grupo não apresentou muitas divergências dos grupos de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Este fato sugere que este isolado seja um rizóbio, porém, possui pouca eficiência em nodular esta planta hospedeira. Deste modo os isolados identificados próximos de *Pleomorphomanas orizae* também foram selecionadas, para verificar a especificidade destes isolados como pau-rainha.

O isolado ERR 377 não foi capaz de nodular o feijão-caupi apesar de ter sido identificada com uma espécie nodulífera (*Rhizobium tropici*). Pagano (2008) verificou que *Centrolobium tomentonsum* é colonizada por bactérias deste gênero apresentando bons rendimentos das plantas. Por este motivo estes isolados foram autenticados em pau-rainha.

Os isolados identificados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* não nodularam, assim como os isolados ERR 469 e ERR 350, próximo de *Burkholderia kururiense* e *Acidisoma tundrae*, respectivamente. Este resultado sugere o isolamento bactérias não nodulífera.

## 5.7 Avaliação da FBN dos rizóbios em mudas de Pau-rainha

No experimento conduzido em casa de vegetação, observou-se que 100 dias após a implantação do experimento as estirpes ERR 326, ERR 399, ERR 435, ERR 417, ERR 314, ERR 412 e ERR 309 se destacaram entre os demais tratamentos e foram capazes de induzir uma elevada nodulação, com média próxima de 200 nódulos por planta (Tabela 5). Nesta mesma avaliação os isolados ERR 396, ERR 329, ERR 305 e ERR 299 obtiveram o segundo melhor resultado com média de 130 nódulos por plantas, seguidos pelos isolados ERR 298, ERR 430 e ERR 421 com média de 90 nódulos por planta. As estirpes de referência proporcionaram a formação de menos de 15 nódulos por planta.

Os isolados ERR 308 e ERR 344, identificados como *Pleomorphomonas orizae* promoveram nodulação em mudas de pau-rainha, indicando que estes isolados apresentam especificidade com hospedeiro de origem. Até o momento, não se conhece a capacidade nodulífera dessas bactérias. No entanto, recentes pesquisas com isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz e pião manso na Coreia e Índia, respectivamente, tem descoberto algumas espécies deste gênero, e demonstraram que elas estão proximamente relacionadas com bactérias da ordem *Rhizobiales* na classe  $\alpha$ -*Proteobacteria* (XIE; YOKOTA, 2005; IM et al., 2006; MADHAIYAN et al., 2013). Este estudo lança uma nova perspectiva sobre estas bactérias, necessitando, porém, novos ensaios de nodulação e caracterização molecular de genes de nodulação para a confirmação da capacidade nodulífera.

Quando avaliada a massa de nódulos secos (MSN), observou-se que as estirpes ERR 326, ERR 399 e ERR 435 novamente apresentaram os melhores resultados juntamente com as estirpes ERR 396, ERR 314 e ERR 309 (tabela 5). As massas desses tratamentos foram acima de 300 mg por planta, sendo estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Os menores valores de massa de nódulos foram obtidos com os tratamentos ERR 430, ERR 421, ERR 377, ERR 380, ERR 305, ERR 299 e BR 3262, além dos tratamentos com as estirpes de referência BR 113 e BR 114, que tiveram valores inclusive inferiores a estas. Esta diferença de nodulação entre os tratamentos inoculados sugere que o pau-rainha apresenta especificidade com rizóbios nativos em diferentes solos de Roraima.



**Tabela 5 - Avaliação de parâmetros de desenvolvimento vegetal obtidos de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) inoculados com rizóbios nativos em ambiente de savana de Roraima.-**

| Tratamento  | NN<br>(Nódulo.planta <sup>-1</sup> ) | MSN<br>(mg.planta <sup>-1</sup> ) | MSPA<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | NT<br>(mg.planta <sup>-1</sup> ) | MSR<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | AF<br>(cm <sup>2</sup> .planta <sup>-1</sup> ) | AP<br>(cm.planta <sup>-1</sup> ) | NF<br>(Folíolos.planta <sup>-1</sup> ) | DC<br>(mm.planta <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| CONTROLE    | -                                    | -                                 | 2,38 b                            | 38,96 d                          | 1,35 b                           | 613,96 c                                       | 12,35 b                          | 13,17 b                                | 2,77 a                           |
| NITROGENADO | -                                    | -                                 | 5,30 a                            | 129,96 a                         | 2,64 a                           | 1348,22 a                                      | 20,75 a                          | 23,33 a                                | 3,51 a                           |
| BR 113      | 6,78 d                               | 32,15 d                           | 2,48 b                            | 36,99 d                          | 1,53 b                           | 654,98 c                                       | 11,43 b                          | 15,17 b                                | 2,77 a                           |
| BR 114      | 1,78 d                               | 8,89 d                            | 2,03 b                            | 30,81 d                          | 1,17 b                           | 571,25 c                                       | 9,85 b                           | 14,67 b                                | 2,40 a                           |
| BR 3262     | 28,72 d                              | 109,97 c                          | 2,30 b                            | 40,61 d                          | 1,24 b                           | 668,71 c                                       | 14,02 b                          | 14,50 b                                | 2,84 a                           |
| ERR 326     | 191,44 a                             | 326,27 a                          | 4,98 a                            | 111,75 a                         | 2,66 a                           | 1408,28 a                                      | 17,38 a                          | 21,83 a                                | 3,36 a                           |
| ERR 399     | 212,00 a                             | 448,28 a                          | 4,71 a                            | 110,78 a                         | 2,47 a                           | 1268,60 a                                      | 18,10 a                          | 21,67 a                                | 3,08 a                           |
| ERR 435     | 187,08 a                             | 320,19 a                          | 4,65 a                            | 105,84 a                         | 2,41 a                           | 1224,08 a                                      | 17,03 a                          | 19,50 a                                | 3,33 a                           |
| ERR 396     | 125,94 b                             | 358,95 a                          | 4,44 a                            | 94,5 b                           | 2,21 a                           | 1144,92 b                                      | 19,50 a                          | 20,67 a                                | 3,22 a                           |
| ERR 329     | 159,06 b                             | 263,67 b                          | 4,34 a                            | 98,49 b                          | 1,99 a                           | 1196,59 a                                      | 21,22 a                          | 21,83 a                                | 3,01 a                           |
| ERR 298     | 74,15 c                              | 225,37 b                          | 4,05 a                            | 86,78 b                          | 2,10 a                           | 1034,48 b                                      | 18,87 a                          | 19,67 a                                | 2,87 a                           |
| ERR 417     | 197,44 a                             | 265,00 b                          | 3,90 a                            | 87,71 b                          | 1,96 a                           | 1064,93 b                                      | 19,15 a                          | 22,83 a                                | 2,90 a                           |
| ERR 314     | 238,50 a                             | 342,03 a                          | 3,80 a                            | 82,03 b                          | 1,93 a                           | 1135,91 b                                      | 20,33 a                          | 18,17 b                                | 2,93 a                           |
| ERR 412     | 190,67 a                             | 295,06 b                          | 3,72 a                            | 73,81 c                          | 1,75 b                           | 1032,75 b                                      | 17,00 a                          | 18,00 b                                | 3,09 a                           |
| ERR 309     | 215,39 a                             | 350,82 a                          | 3,06 b                            | 67,77 c                          | 1,45 b                           | 1003,96 b                                      | 17,68 a                          | 21,33 a                                | 2,84 a                           |
| ERR 430     | 97,11 c                              | 132,10 c                          | 2,85 b                            | 69,93 c                          | 1,17 b                           | 935,67 b                                       | 15,50 b                          | 19,33 a                                | 2,55 a                           |
| ERR 421     | 97,39 c                              | 153,07 c                          | 2,86 b                            | 68,30 c                          | 1,41 b                           | 832,31 c                                       | 15,13 b                          | 16,00 b                                | 2,64 a                           |
| ERR 377     | 3,52 d                               | 15,34 d                           | 2,45 b                            | 37,50 d                          | 1,50 b                           | 670,71 c                                       | 11,83 b                          | 15,16 b                                | 2,72 a                           |
| ERR 380     | 66,96 c                              | 106,02 c                          | 2,67 b                            | 37,05 d                          | 1,78 b                           | 726,09 c                                       | 16,18 a                          | 14,66 b                                | 2,93 a                           |
| ERR 305     | 121,89 b                             | 155,30 c                          | 2,29 b                            | 56,40 c                          | 1,02 b                           | 807,99 c                                       | 15,33 b                          | 18,17 b                                | 2,36 a                           |
| ERR 299     | 112,61 b                             | 168,07 c                          | 2,26 b                            | 52,29 d                          | 1,26 b                           | 657,97 c                                       | 12,88 b                          | 16,83 b                                | 2,31 a                           |
| ERR 308     | 133,39 b                             | 229,67 b                          | 3,42 b                            | 83,02 b                          | 1,56 b                           | 1035,19 b                                      | 15,60 b                          | 20,50 a                                | 2,80 a                           |
| ERR 344     | 25,91 d                              | 104,01 c                          | 2,83 b                            | 51,08 d                          | 1,58 b                           | 799,00 c                                       | 13,95 b                          | 17,33 b                                | 2,90 a                           |
| C.V. (%)    | 25,89                                | 29,70                             | 20,69                             | 22,03                            | 22,39                            | 15,87  | 18,00                            | 17,44                                  | 12,16                            |

- AP: Altura da Planta; DC: Diâmetro do Colo; AF: Área Foliar; NF: número de Folíolos; MSPA: Matéria seca da parte aérea; MSR: Matéria seca de raiz; NT: Nitrogênio Total; NN: número de nódulos; MSN: Matéria seca de nódulos.

- Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo Santos; Reis (2008), a lecitinas produzidas pelas plantas hospedeiras, bem como a formação de biofilme por rizóbios pode ser um fator de especificidade no sentido de promover melhor adesão dos rizóbios, tornando o processo de nodulação mais eficiente, sobretudo em condições naturais, em virtude da diminuição da competição por sítio de nodulação. Entretanto, os mesmos autores ressaltam que as etapas que sucedem a nodulação ainda não são bem elucidadas, havendo diversos fatores e mecanismos intrínsecos aos hospedeiros e microssimbiontes que podem refletir em uma maior ou menor nodulação.

Ainda com relação aos nódulos notou-se que em nenhum dos tratamentos foi observada a presença de nódulos senescentes mesmo após os 100 DAE, indicando que o processo de nodulação em pau-rainha perdure por mais tempo devido à necessidade constante de N para o desenvolvimento das plantas. Pagano (2008) ao avaliar a nodulação de *Centrolobium tomentosum* em condições naturais constatou a presença de nódulos ativos aos 16 e 24 meses após a instalação de experimento em uma mata ciliar. Estas informações são bastante relevantes e demonstram o potencial das leguminosas arbóreas em introduzir grande quantidade de N ao longo de anos em função da FBN e produção de MOS.

Com relação à MSPA foi observado que dos 21 tratamentos inoculados, 10 tratamentos proporcionaram acúmulo de matéria seca da parte aérea (MSPA) variando acima de  $3,70 \text{ g.planta}^{-1}$ , sendo estatisticamente igual ao tratamento nitrogenado (figura 11, apêndice H) (Tabela 5). Por outro lado, as estirpes referência, bem como as bactérias ERR 309, ERR 430, ERR 421, ERR 305 e ERR 299 (figura 12 e 13 apêndice H) pouco contribuíram ou mesmo não contribuíram para o incremento da matéria seca das plantas, sendo estatisticamente iguais ao controle não inoculado.

A MSPA de leguminosas inoculadas constitui uma das mais importantes variáveis para atestar a promoção do crescimento vegetal em função da FBN, havendo uma correlação direta com a concentração de N encontradas na parte aérea da planta (tabela 5) (SOUZA et al., 2008).

De fato, as estirpes ERR 326, ERR 399 e ERR 435, as quais proporcionaram a melhor produção de biomassa, proporcionaram acúmulo N-total na parte aérea iguais, estatisticamente, ao tratamento nitrogenado ( $100 \text{ mg.planta}^{-1}$  de N). Já os tratamentos inoculados com os isolados ERR 396, ERR 329, ERR 298,

ERR 417, ERR 314 apresentaram concentrações de N inferiores aos tratamentos anteriormente citados, no entanto proporcionaram cerca de 136% de N a mais que o tratamento controle. As demais bactérias testadas mostraram-se menos eficientes em incorporação N às plantas de pau-rainha, com 76% a mais que o tratamento controle, com exceção das estirpes de referência e o isolado ERR 299 que apresentaram resultados inferiores (Tabela 5).

A produção de raízes também foi influenciada pela inoculação de rizóbios de pau-rainha. Dos 21 tratamentos inoculados oito apresentaram incrementos na massa seca de raiz superior a  $1,9 \text{ g.planta}^{-1}$ , sendo que o melhor resultado foi alcançado pelo tratamento inoculado com o isolado ERR 326 com  $2,66 \text{ g.planta}^{-1}$ , seguido pelos tratamentos ERR 399, ERR 435, ERR 396, ERR 298, ERR 417 e ERR 314. Os demais tratamentos obtiveram médias significativamente inferiores aos tratamentos anteriormente citados e não diferiram do tratamento controle com média de  $1,35 \text{ g.planta}^{-1}$ .

Outro resultado importante foi a correlação direta entre a produção de raízes e os parâmetros de MSPA, AF e NT (Tabela 6 em apêndice G) corroborando com Raven; Evert; Eichhorn (2007), que relata que as substâncias orgânicas sintetizadas durante a fotossíntese nas porções aéreas das plantas são transportadas para os tecidos radiculares e boa parte destas é utilizada para extensão, bem como produção de novas raízes secundárias e radículas. Por tanto, a produção de raízes, na ausência de fatores que limitam seu crescimento tais como, a compactação do solo e a toxidez por Al, estão correlacionadas ao desenvolvimento de órgãos vegetativos das plantas.

Ao avaliar a área foliar (AF) foi possível realizar uma melhor distinção dos tratamentos em três grupos. Os tratamentos incluídos no primeiro grupo foram plantas inoculadas com as estirpes ERR 326, ERR 399, ERR 435 e ERR 329, que também foram as que apresentaram maior massa seca da parte aérea e N-acumulado, apresentando resultados significativamente superiores aos demais tratamentos, com exceção do tratamento nitrogenado. O segundo grupo, assim como o primeiro foi representado exclusivamente por tratamentos inoculados com isolados de pau-rainha, no entanto a resposta das plantas com relação à superfície foliar foi inferior aos obtidos pelos tratamentos do primeiro grupo. Já o terceiro grupo

foi o que menos influenciou sobre a superfície foliar, sendo em média cerca de 50% inferior a alguns tratamentos que apresentaram os melhores resultados (Tabela 5).

Considerando que a área foliar está relacionada com a capacidade fotossintética das plantas, a possibilidade de aumentá-la a partir da FBN implica em um melhor desenvolvimento vegetal de forma mais rápida, tendo como consequência as chances de sobrevivência das plantas em condições de campo (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além do mais, pressupondo que a nodulação nesta leguminosa arbórea perdure por longos períodos como constatado em Pagano (2008) para espécie *Centrolobium tomentosum*, bem como seus efeitos benéficos sob a área foliar, o pau-rainha pode ter um papel significativo na proteção da estruturação de solos como relatado por Franco; Campello (2005).

Apesar de não ser usualmente aplicada para avaliar a eficiência de rizóbios em promover crescimento vegetal, AF mostrou-se bastante útil na seleção dos melhores rizóbios associados às raízes de pau-rainha havendo uma relação direta com o N-total incorporado as plantas apresentando um coeficiente de correlação bastante elevado ( $R^2 = 0,9404$ ) (Tabela 6 em apêndice G), corroborando com Fernandes; Fernandes (2000) que observaram uma correlação de  $R^2 = 0,8860$ .

De uma maneira geral, as estirpes que apresentaram maior acúmulo de matéria seca, também foram as que contribuíram para uma maior altura da planta e também para o desenvolvimento de maior número de folíolos (Tabela 5), havendo apenas algumas exceções com relação ao tratamento inoculado com o isolado ERR 309 que mesmo obtendo baixo valor de MSPA, proporcionou um dos maiores desenvolvimento em altura comparativo ao obtidos com tratamento nitrogenado. O mesmo ocorreu para a variável NF nos tratamentos inoculados com os isolados ERR 309 e ERR 430 e de maneira inversa para os tratamentos com os isolados ERR 314 e ERR 412. Estas diferenças nos resultados podem estar relacionadas à variabilidade genética da espécie, uma vez que as sementes foram coletadas de plantas silvestres da área VI.

O diâmetro do caule (DC) foi a única variável não variou significativamente entre os diferentes tratamentos obtendo média geral de 2,88 mm. Este resultado já era esperado uma vez que o tempo de experimento (100 dias) é considerado curto para o crescimento secundário do caule de pau-rainha. Tonini et al. (2006)

verificaram que plantas de *C. paraense* com seis anos de idade apresentaram DAP de 7,3 cm, indicando que desenvolvimento do caule de pau-rainha é lento.

Compilando dos dados de NN e MSN verificou-se que as estirpes de referência utilizadas possuem baixa eficiência em nodular raiz de pau-rainha, o que resultou nos piores resultados em todos os parâmetros de eficiência em FBN. Estes resultados reforçam a hipótese de que *C. paraense* apresenta especificidade em estabelecer simbiose com outras estirpes de rizóbio, ou mesmo com outras espécies de *Bradyrhizobium* nativas dos solos de Roraima, devido processos de co-evolução entre hospedeiro e microssimbiontes resultantes das pressões evolutivas inerentes às condições edafoclimáticas presentes nas savanas de Roraima.

Sugere-se ainda, que os solos de Roraima possuem estirpes de rizóbios com grande capacidade de fixar N em associação ao pau-rainha, podendo ser recomendadas como inoculantes para *Centrolobium paraense*. Este resultado pode fomentar programas de recuperação de áreas degradadas ou a introdução desta espécie em sistemas agrosilvipastoris com um menor custo com fertilizantes nitrogenados. Restando, no entanto avaliar a capacidade competitiva desses rizóbios com outras bactérias nativas dos solos de Roraima.

## 5.8 Análise de Sequências Multilocus (MLSA)

Para a MLSA foram selecionados apenas os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, os quais apresentaram maior eficiência da FBN em pau-rainha.

Estes isolados foram submetidos a amplificação e sequenciamento dos genes *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoBe* *dnaK*. Durante o processamento das sequências verificou-se que todas as sequências do gene *dnaK* apresentaram poucas bases ou exibiam sobreposições de picos no cromatograma, tornando impróprias para a construção da árvore filogenética. As sequências dos genes *glnII*, *gyrB* e *recA* para os isolados ERR 326, ERR 299 e ERR 421, respectivamente, não foram utilizadas nas árvores filogenéticas devido as suas baixas qualidades.

Para o gene *glnII* foram obtidas sequências variando entre 645 e 683 bases. A partir dessas sequências foi possível a construção da árvore filogenética do gene *glnII* apresentando três grandes grupos suportado por bootstrap maiores de 73 e

80% (Figura 14). No grupo I, foram incluídos oito isolados de pau-rainha, os quais formaram três sub-grupos bastante divergentes de todas as estirpes tipo com valores de bootstrap superiores a 98%, indicando se tratar de três novas espécies de *Bradyrhizobium*.

No sub-grupo I-1 ficaram reunidos os isolados ERR 417, ERR 421, ERR 430 e ERR 435, todos originários da área VI. Os sub-grupos I-2 e I-3 também foram formados a partir uma mesma área de coleta. Assim, o sub-grupo I-2 foi constituído pelas estirpes ERR 299, ERR 305 e ERR 314 da área I, enquanto que os isolados ERR 396 e ERR 399 foram incluídos no sub-grupo I-3, representando rizóbios da área V.

Dentro de cada sub-grupo os isolados não apresentam distâncias significativas. No entanto, os resultados de similaridade pela técnica de BOX-PCR demonstram grandes divergências entre os mesmos, indicando o isolamento de estirpes diferentes. De fato, este resultado explica, em parte, a diferença de eficiência na FBN em pau-rainha entre organismos incluídos nos sub-grupos I-1 e I-3. Neste sentido, estudos de caracterização genética da população de pau-rainha podem contribuir bastante para o entendimento relação de especificidade com rizóbios locais.

O isolado ERR 298 também foi incluído no grupo I, porém não formou em sub-grupos devido haver grandes divergências genéticas com relação as demais estirpes. Da mesma forma ocorreu para as estirpes tipo de *B. yuanmingense*, *B. arachidis*, *B. daqingense*, que constituíram ramos monofiléticos.

O grupo II foi formado somente por estirpes tipo, as quais mostraram-se distante entre si, demonstrando que a filogenia baseada no gene *glnII* representa uma alternativa molecular bastante adequada para estudos de diversidade de *Bradyrhizobium*. Esta capacidade também foi comprovada por Menna et al. (2009) ao analisarem 169 isolados de *Bradyrhizobium* obtidos de diversas leguminosas de vários países.

O grupo III foi formado com 80% de bootstrap e incluiu os isolados de pau-rainha ERR 412, ERR 309 e ERR 329 juntamente com as estirpes tipo de *B. jicamae*, *B. lablabi*, *B. pachyrhizi* e *B. elkanii*. A aproximação filogenética entre estas estirpes tipo também foi obtida por Delamuta et al. (2012), e demonstra que o gene apresenta alta reprodutibilidade, facilitando a comparação com outros estudos.

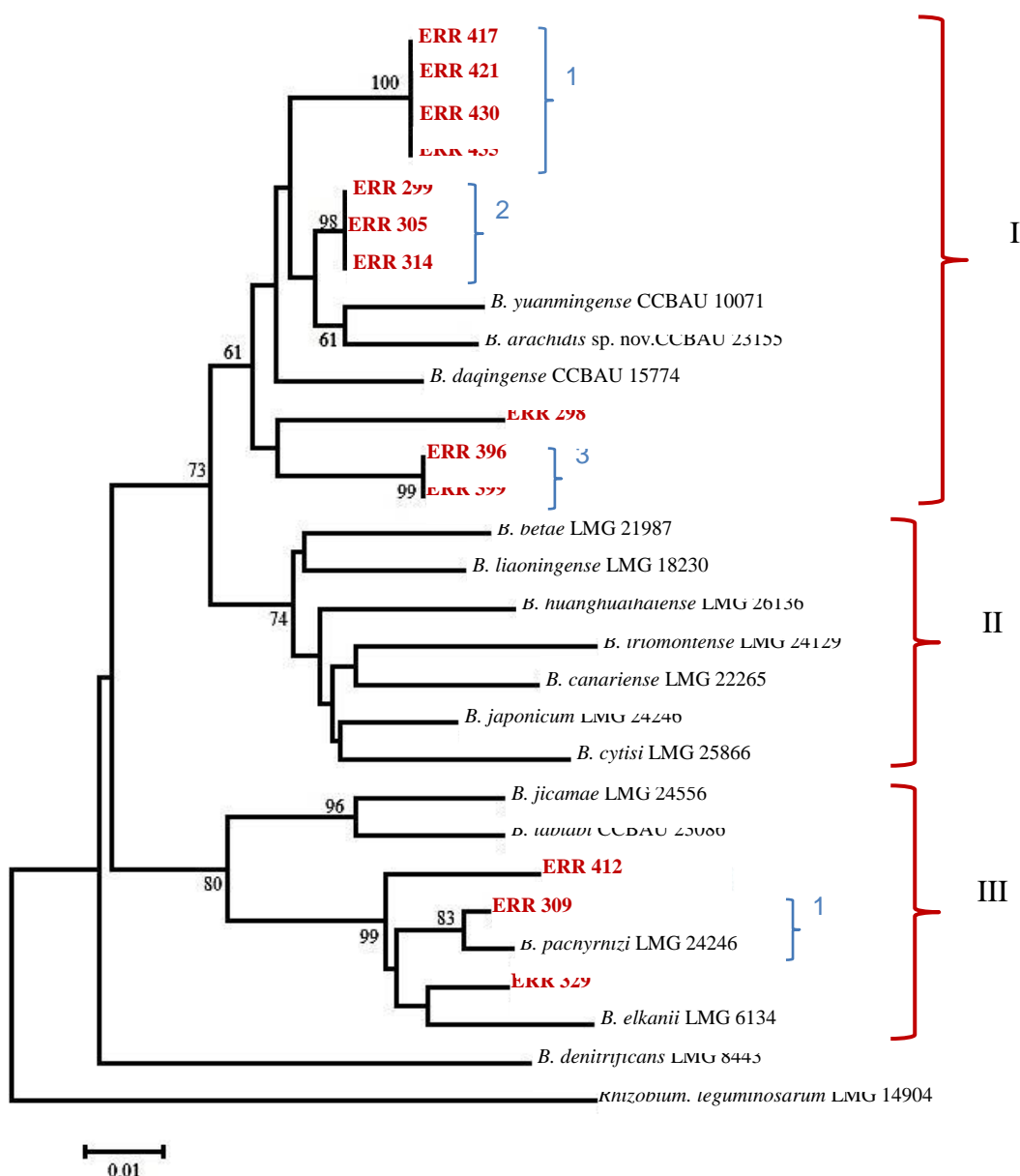


Figura 14. Filogenia baseada em sequências do gene *glnII* obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero *Bradyrhizobium*. A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.

A árvore filogenética do gene *gyrB* foi construída da mesma forma para o gene *glnII*, com 414 sítios analisados. Destes, 118 mostraram-se conservados e 71% dos sítios (296) com variações de bases, corroborando com os resultados de Tayeb et al. (2008) que encontraram 67% de polimorfismo de bases nitrogenadas quando analisaram a filogenia de 54 isolados. Estes mesmos autores relatam que o gene *gyrB* apresenta uma evolução rápida o que proporcionaria uma maior

percentagem de divergência entre os grupos formados. No entanto, neste estudo foi verificado que o gene *gyrB* foi o que apresentou as menores distâncias filogenéticas entre os organismos analisados. Apesar disso, pode-se observar a formação de quatro grupos (figura 15).

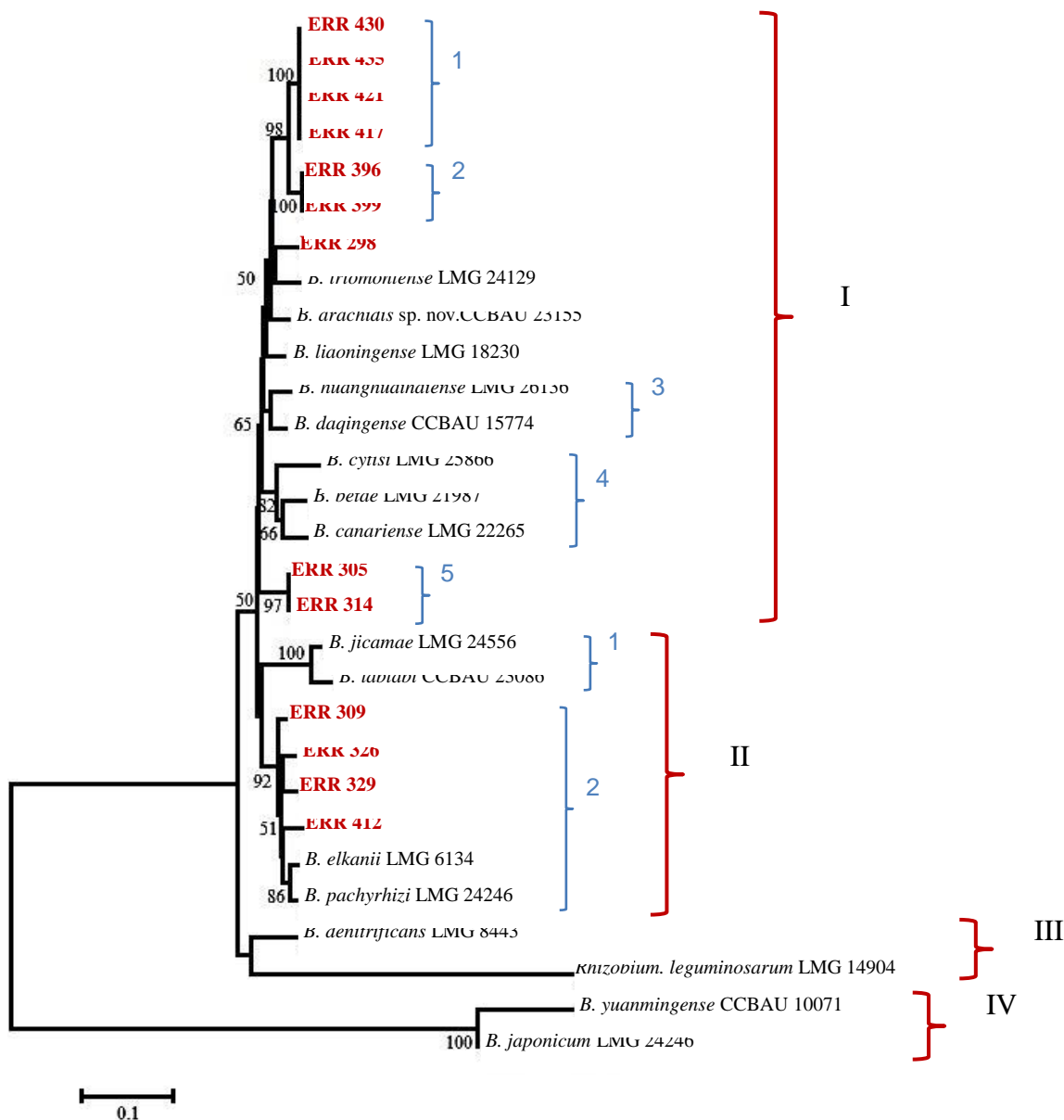


Figura 15. Filogenia baseada em seqüências do gene *gyrB* obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero *Bradyrhizobium*. A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.



No primeiro grupo nota-se que os sub-grupos I-1, I-2 e I-5 foram compostos apenas por isolados de pau-rainha, incluindo os mesmos isolados dos sub-grupos I-1, I-3 e I-2 da árvore do gene *glnII* (figura 14), respectivamente.

Ainda com relação ao grupo I, verificou-se que o isolado ERR 298 teve maior proximidade com a estirpe tipo de *B. iriomontense*. No entanto, não se pode afirmar que esta pertença a mesma espécie, uma vez que a distância entre estas bactérias é semelhante a encontrada para outras estirpes tipo (Figura 15). Nesta circunstância, a utilização das técnicas de quimiotaxonomia como assimilação de fontes de carbono, resistência a antibióticos, bem como a hibridização DNA-DNA podem gerar dados importantes para elucidar a identificação dessas bactérias.

No grupo II, os isolados ERR 309, ERR 326, ERR 329 e ERR 412 permaneceram juntas no sub-grupo II-2, ficando mais próximas as estirpes tipo de *B. elkanii* e *B. pachyrhizi*, como demonstrado na filogenia do gene *glnII*.

Com relação aos genes *recA* e *rpoB*, os fragmentos obtidos após o sequenciamento variaram entre 583–617 e 919-1027 nucleotídeos, respectivamente. Ambos os genes apresentaram boa capacidade de distinguir as espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium* e geraram árvores filogenéticas (figura 16 e 17) semelhantes às dos genes *glnII* e *gyrB*. Entretanto, a inclusão do isolado ERR 309 no sub-grupo I-1, assim como a exclusão da estirpe de *B. elkanii* do grupo III na árvore filogenética do gene *recA* representaram as únicas divergências entre os agrupamentos gerados pelos outros genes *housekeeping*.

De maneira geral, as filogenias dos quatro genes *housekeeping* mostraram que os isolados ERR 430, ERR 435, ERR 421 e ERR 417 tenderam a se manter próximas entre si e distantes dos demais isolados e estirpes de tipo de *Bradyrhizobium*. Este fato se repetiu para os isolados ERR 396 e ERR 399, bem como para os isolados ERR 299, ERR 305 e ERR 314. Este resultado indica o isolamento de novas espécies do gênero *Bradyrhizobium* colonizando raízes de pau-rainha, sendo necessário mais estudos para confirmação desta hipótese.

Por outro lado, as estirpes ERR 412, ERR 309, ERR 329 e ERR 326 mostraram-se mais próximas das estirpes tipo de *B. elkanii* e *B. pachyrhizi*, assim como o isolado ERR 298, na maioria dos casos, se agrupou com a estirpe de *B. iriomontense*.

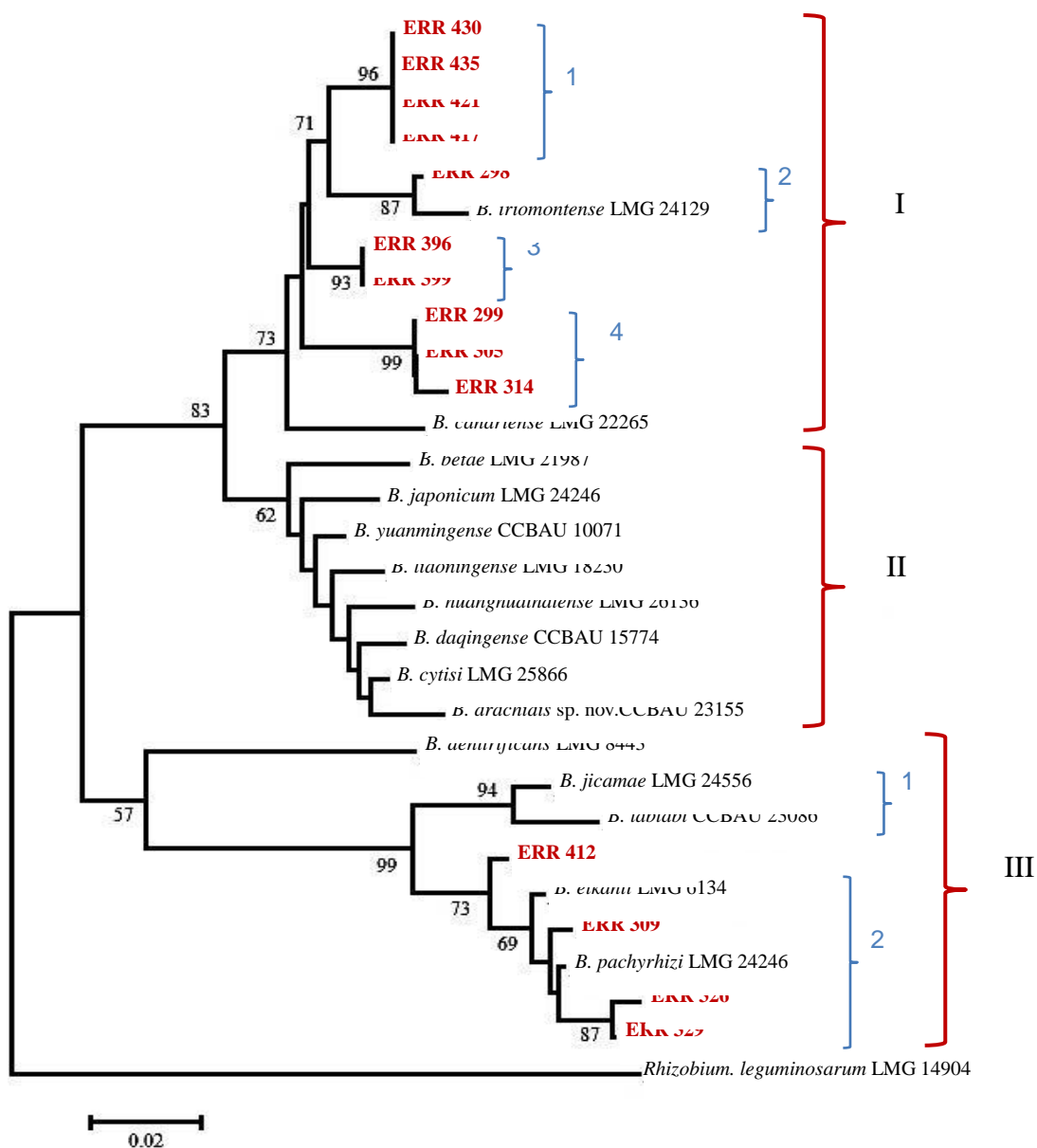


Figura 16. Filogenia baseada em sequências do gene *rpoB* obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero *Bradyrhizobium*. A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.

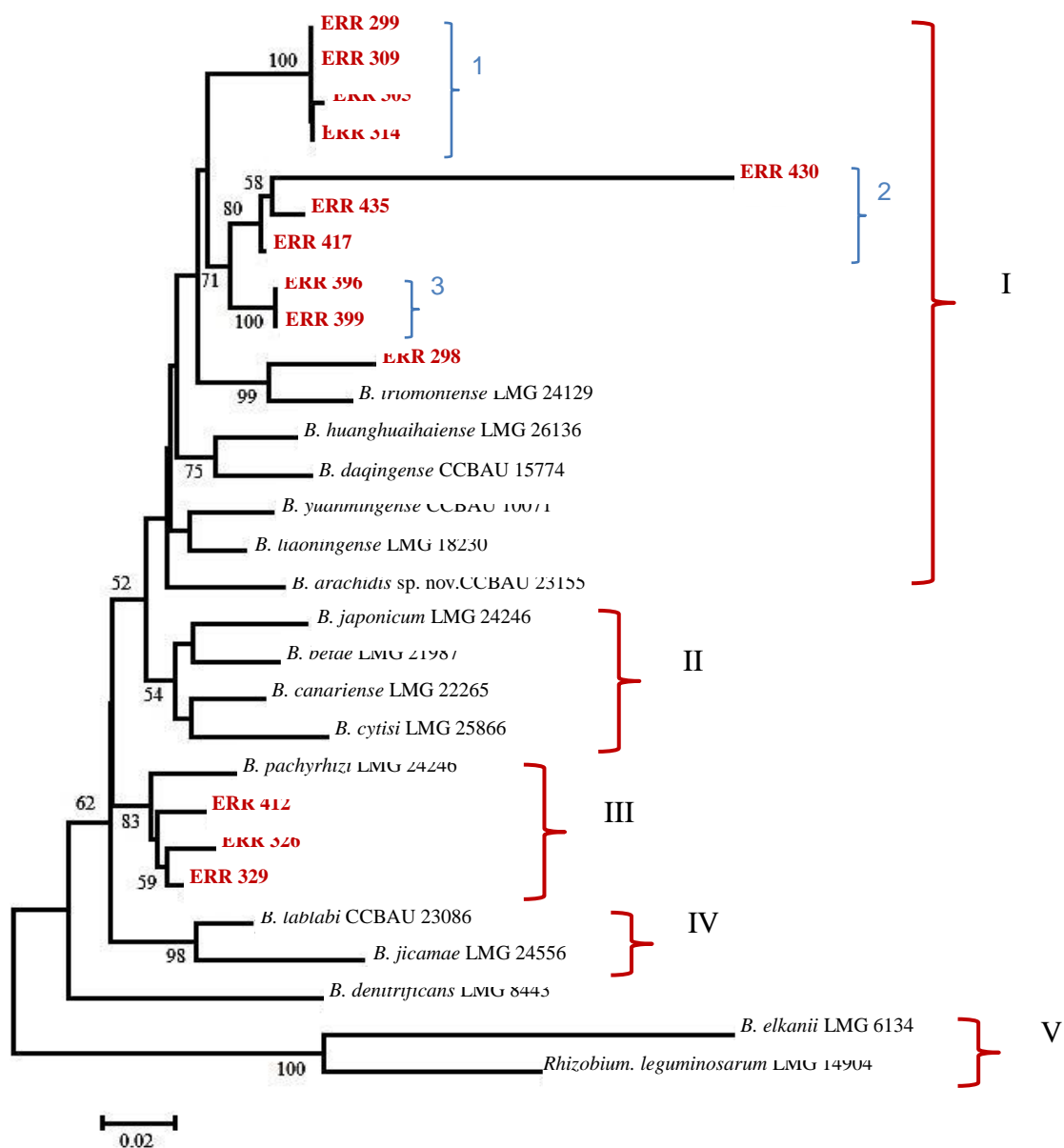


Figura 17. Filogenia baseada em sequências do gene *recA* obtidas de isolados de pau-rainha e estirpes de referências para o gênero *Bradyrhizobium*. A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições.

## 5.9 Análise concatenada de sequências multilocus

Para a análise concatenada não foram utilizadas as sequências dos isolados ERR 421, ERR 299 e ERR 326, devido a baixa qualidade das sequências dos genes *recA*, *gyrB* e *glnII*, respectivamente.

Para cada isolado de pau-rainha e estirpes de tipo foi realizado a junção das sequências dos genes *rpoB*, *gyrB*, *recA* e *glnII*, anteriormente alinhadas, formando uma única sequência de 1318 nucleotídeos. A partir dessas sequências foi gerada uma árvore filogenética, onde foi possível verificar a formação quatro grandes grupos sustentados por bootstrap de 85, 83, 56 e 78 % (figura 19).

Comparando o resultado da árvore filogenética concatenada com os obtidos nas análises individuais dos genes *housekeeping*, notou-se uma consistência na formação de grupos e sub-grupos, de maneira que os rizóbios de pau-rainha mantiveram distanciados das estirpes de tipo de *Bradyrhizobium*.

No grupo I, foram agrupadas a maioria (8) dos rizóbios isolados de pau-rainha e a estirpe tipo de *B. iriomontense*. Estes isolados foram organizados em quatro sub-grupos, sendo sustentado por elevados valores de bootstrap (figura 19). Para os sub-grupos I-1, I-2 e I-3. Para cada um desses sub-grupos, notou-se uma forte correlação com os locais de origem dos rizóbios, onde o sub-grupo I-1 foi representado pelos isolados ERR 430, ERR 435 e ERR 417, os quais foram isolados da área VI; o sub-grupo I-2 foi formado pelas bactérias ERR 396 e ERR 399, sendo estes, obtidos do solo da área V; e o sub-grupo I-3 que incluiu os isolados ERR 305 e ERR 314 originários da área I.

Este fato pode estar correlacionado com as fitofisionomias e as condições edáficas destas áreas. As áreas I e V são representativas de ilhas de mata, no entanto apresentam diferenças quanto ao tamanho do fragmento, bem como no pH do solo. Estes fatores tem influência direta na ecologia das populações de rizóbios. Por um lado, a acidez representa uma barreira seletiva, no qual os rizóbios tolerantes ao baixo pH e toxidez por alumínio prevalecem (CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009a; CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009b; CHAGAS JUNIOR et al., 2010). Por outro lado, os tamanhos de fragmento e a composição de florestas determinam a maior ou menor incidência de radiação sobre o solo, bem como o teor de umidade e temperatura do solo (ESPÍRITO-SANTO et al.,

2002), podendo estes fatores físicos favorecer ou suprimir determinadas espécies de rizóbios nestas condições. A área VI, no entanto, representa um floresta de transição, que é caracterizada por apresentar uma floresta mais densa com maior acúmulo de matéria orgânica e umidade, sendo bastante distinta das ilhas de mata, o que poderia favorecer outros rizóbios com mecanismos adaptativos para este ambiente.

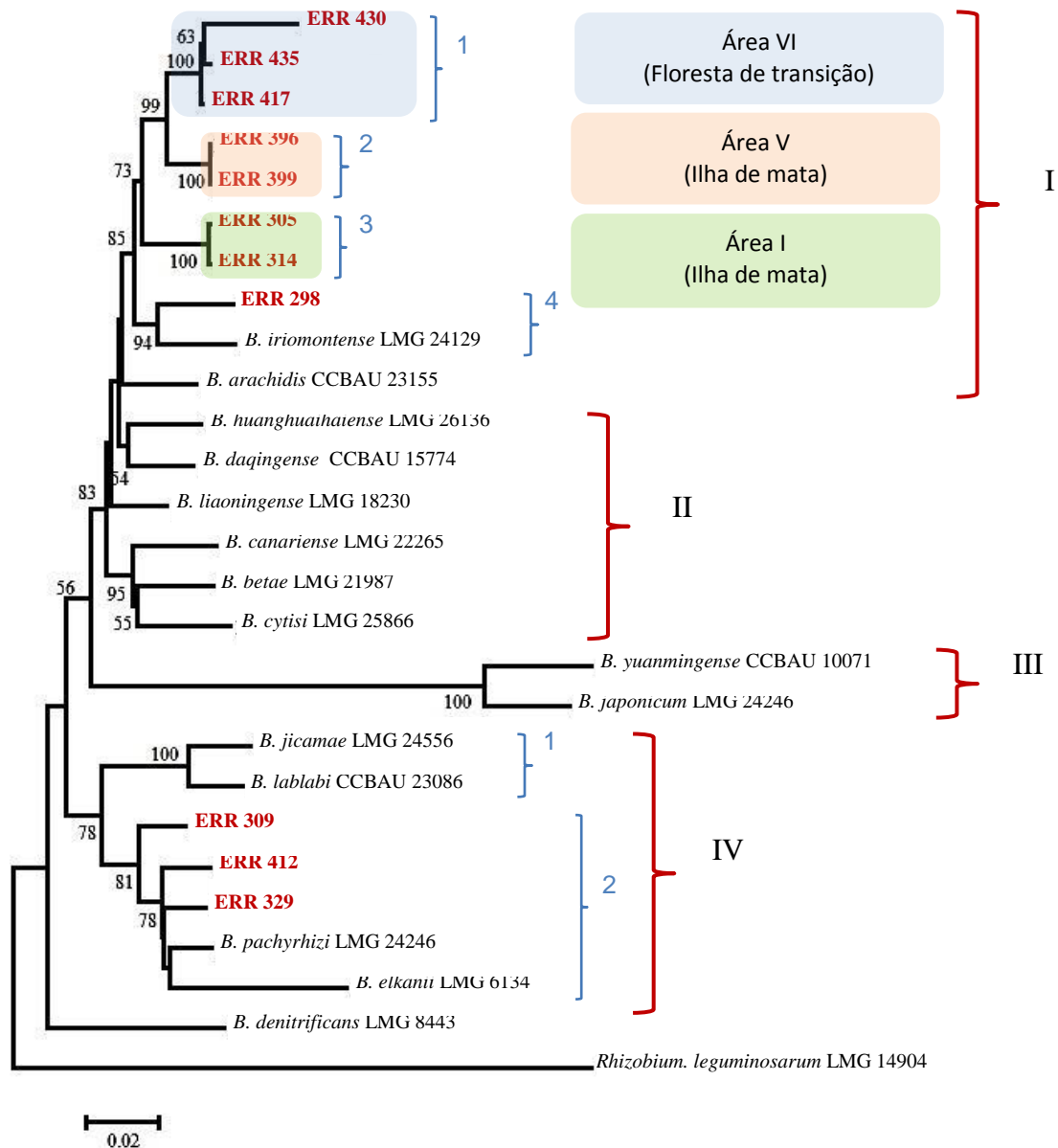


Figura 18. Filogenia baseada em sequências concatenadas dos genes *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e *recA* obtidas de rizóbios de pau-rainha e estirpes tipo para o gênero *Bradrhizobium*. A árvore foi gerada a partir do método estatístico Neighbor-joining com cálculo de distância pelo modelo Kimura's 2-parameter com 1000 repetições. Em destaque: grupos correlacionados com as áreas de isolamento.

O quarto sub-grupo (I-4) foi constituído pelo ERR 298 isolado que apresentou mais próxima da estirpe tipo de *B. iriomontense*. O grupo II e III envolveram somente estirpes de referência, apresentando grandes distâncias filogenéticas entre elas.

No quarto grupo (IV), assim como demonstrados em resultados anteriores, os isolados ERR 309, ERR 329 e ERR 412 se apresentaram mais próximos das estirpes de *B. elkanii* e *B. pachyrhizi*, sendo necessária a aplicação de outros testes fenotípicos ou mesmo a utilização de outros genes para a identificação de cada isolado de pau-rainha. Estes resultados corroboram com Ramírez-Bahena et al. (2009) que demonstraram que estirpes de *B. elkanii* e *B. pachyrhizi* apresentam poucas divergência filogenéticas, sendo necessária a diferenciação a partir de teste de assimilação de fontes de carbono e de resistência á antibióticos. Adicionalmente pode-se utilizar outros marcadores moleculares que apresentam maiores divergência evolutivas como os genes *nodD* e *nifHou* mesmo a realização da técnica de hibridização DNA-DNA (Ramírez-Bahena et al., 2009).

Este estudo deixou evidente que o pau-rainha está associado a uma grande diversidade de espécies de rizóbios eficientes, e provavelmente a novas espécies não descritas, demonstrando, assim, o potencial de recursos biológico presente no estado Roraima e justificando a necessidade de novos estudos relacionados a nodulação e a diversidade de rizóbios associadas a esta e outras leguminosas da Amazônia.

Vale ressaltar que este estudo representou um importante passo de implementação do cultivo desta espécie de suma importância para o equilíbrio ambiental, e com potencial de exploração de subprodutos madeireiros. Pesquisas complementares estão sendo executadas pela Embrapa Roraima e poderão servir de base para estudos futuros de ecologia microbiana, bem como para a recomendação de inoculantes eficientes para *Centrolobium paraense*.

## 6 Conclusões

- O pau-rainha é capaz de estabelecer simbiose com uma grande diversidade de rizóbios nativos em ambiente de savana de Roraima, com predominância de isolados do gênero *Bradyrhizobium*.

- Os rizóbios de pau-rainha apresentaram grandes divergências em relação às estirpes tipo utilizadas, indicando o isolamento de novas espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium*.
- Os rizóbios ERR 326, ERR 399, ERR 435 foram os mais eficientes dentre todos os rizobios avaliados, podendo representar uma alternativa para produção de mudas de pau-rainha com alto rendimento, semelhante a outra com adubação nitrogenada.

## REFERÊNCIAS

ACINAS, S. A.; MARCELINO, A. L.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of *16S rRNA* sequences in genome with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.189, n. 9, p.2629-2635, 2004.

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORETINO, L. A., RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meio de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BARBOSA, R. L.; CAMPOS, C.; PINTO, F.; FEARNSIDE, P. M. The “Lavrados” of Roraima: biodiversity and conservation of Brasil’s Amazonian savannas. **Ecosyst. and Communities**. v. 1, n. 1, p. 1-26, 2007.

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on sequencing of the *16S rRNA* gene of elite comercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v .83, n. 5, p. 897-908. 2009.

BONTEMPS, C; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; JÚNIOR, F. B. DOS R.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J . P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**. Oxford, v.19, n. 1, p. 44–52, 2009.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 5**, anexo 2, de 6 de agosto de 2004

CARVALHO, A. M.; ALVES, B. J. R.; PEREIRA, L. L. **Emissão de óxido nitroso do solo com aplicação de fontes de fertilizantes nitrogenados em sistema plantio direto no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 281).

CHADA, S. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista. Árvore**, Viçosa, v.28, n. 6, p.801-809, 2004.



CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, **Acta Amazônica**, v. 39, n. 2, p. 467 – 470, 2009a.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 6, p. 812-817, 2009b.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E.J. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha. v. 61, n. 12, p. 2922-2927, 2011.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAN, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 330–339. 2007.

CHANG, Y. L.; WANG, J. Y.; WANG, E. T.; LIU, H. C.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 61, n. 10, p. 2496-2502. 2011.

COSTA, G. S.; FRANCO, A. A.; DAMACENO, R. N.; FARIA S. M. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Viçosa, v. 28, n. 5, p. 919-927, 2004.

CUNHA, R. L.; REIS, T. H. P.; CARVALHO, V. L.; ALVARENGA, M. I. N.; ALCANTÂRA, E. N. **Viabilidade técnica da consorciação de aléias de leguminosas arbóreas com cafeeiros no sul de Minas Gerais**. 2009 Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/3710>. Acesso em: 10 fev. 2013.

DELAMUTA J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (*mlsa*) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high

diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.43, n. 2, p. 698-710, 2012.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. Leguminosas arbóreas introduzidas em pastagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 119-126, 2007.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; RESENDE, A. S.; URQUILAGA, S.; ROCHA, G. P.; MOREIRA, J. F.; FRANCO, A. A. Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para o capim *Survinola* crescido em consórcio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 352-356, 2007.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 1997. 212 p. (Documentos 1).

ESPÍRITO-SANTO, F. D. B.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; MACHADO, E. L. M.; SOUZA, J. S.; FONTES, M. A. L.; SÁ, J. J. G.; MARQUES, M.. Variáveis ambientais e a distribuição de espécies arbóreas em um remanescente de floresta estacional semidecídua montana no campus da Universidade Federal de Lavras, MG. **Acta Botanica Brasilica**. São Paulo, v.16, n. 3, p. 331-356, 2002.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Documento 158).

FARIA, S. M. de; LIMA, H. C.; OLIVEIRA, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de leguminosas. p. 667–686. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.;

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS, 1999. 818 p.

FARIA, S. M. de; MOREIRA, J. F.; CORDEIRO, F. C.; MACHADO, R. L. **Obtenção de estirpes de rizóbios para leguminosas florestais (aproximação de 2004)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 10 p. (Comunicado Técnico 61).

FARIA, S. M. de; MACHADO, R. L.; UCHOAS, E. S. **Dependência de fungos micorrizicos arbusculares na seleção de estirpes de rizóbios para pau jacaré (*Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr), em substrato autoclavado**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 4 p. (Comunicado técnico 83).

FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J. F.; FAGG, C. W.; MACHADO, J. W. B. **Recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 45 p. (Documento 21).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Viçosa, v. 24, p. 321-327, 2000.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio como fonte de nitrogênio. p. 201-220. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa, 2005. 368p.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Yeast Extract – **Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145p.

GOMES, F. T. BORGES, A. C.; FONTES, P. C. R.; NEVES, J. C. L. Nodulação, fixação de nitrogênio e produção de matéria seca de alfafa em resposta a doses de calcário, com diferentes relações cálcio:magnésio. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 32, n. 6, p.925-930, 2002

GRAHAM, P. H. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. p. 23-58. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

HARA, F. A. S., OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v.34, n. 3, p.343-357, 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Irvine: University of California, 1950. 347p.

HOWIESON, J. G.; YATES, R. J.; FOSTER, K. J.; LEAL, D.; BESIER, R. B. Prospects the future of use legumes. p. 363-393. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

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. 80 p. (Documento 283).

HUNGRIA, M; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina:Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Comunicado técnico 79).

IBGE. **Manual da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1992. 92 p.

IM, W.; KIM, K.; KIM, M. K.; TEN, L. N.; LEE, S. *Pleomorphomonas koreensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species in the order *Rhizobiales*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 56, n. 7, p. 1663-1666, 2006.

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Tokyo, v. 72, n. 6, p. 1416-1429. 2008.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**. v. 11, p. 37–50, 1912.

JARAMILLO-BOTERO, C.; SANTOS, R. H. S.; FARDIM M. P.; PONTES. T. M.; SARMIENTO, F. Produção de serapilheira e aporte de nutrientes de espécies arbóreas nativas em um sistema agroflorestal na zona da mata de Minas Gerais. **Revista Árvore**. Viçosa , v. 32, n. 5, p. 869-877, 2008.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M de. Dependência de micorrização de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 545-552, 2005.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Ames, v. 32, p. 136-139. 1982.

KAMINSKI, P. E. **O pau-rainha (*Centrolobium paraense*): características, potencialidades e usos**. Roraima: Embrapa Roraima, 2004. 31 p. (Documentos 10).

KIERS, E. T.; WEST, A. S.; DENISON, R. F. Maintaining cooperation in the legumerhizobia symbiosis: identifying selection pressures and mechanisms. p. 59-73. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. p. 117-152. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

KROLOW, R. H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W.; SIEWERDT, L.; ZONTA, É. P.R. Efeito do Fósforo e do Potássio sobre o Desenvolvimento e a Nodulação de Três Leguminosas Anuais de Estação Fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.33, n.6, p.2224-2230, 2004

KUYKENDAL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE. T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa. v. 38, n. 6, p. 501-505. 1992.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B .D. *Leguminosae* or *Fabaceae*? In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.) **Advances in legume systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew. 2003. 422 p.

LIAO, C. F. H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 45, n. 5, p. 852-855, 1981.

LOPES, L. A.; NASS, L. L.; MELLO, I. S. de. Bioprospecção. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Viçosa, v. 3, n. 34, p. 72-75, 2005.

MADHAIYAN, M.; JIN, T. Y.; ROY, J. J.; KIM, S.; WEON, H.; KWON, S; JI, L. *Pleomorphomonas diazotrophica* sp. nov., a novel endophytic N-fixing bacterium isolated from the root tissue of *Jatropha curcas* L. **International Journal of**

**Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, doi: 10.1099/ijs.0.044461-0, 2013.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, , v. 58, n 1. p. 200-214, 2008.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE F. M.; FRANCO A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 41, n. 3, p 417-426, 1991.

MATOS, L. V.; CAMPELLO, E. F. C.; RESENDE A. S. de. **Plantio de leguminosas arbóreas para a produção de moirões vivos e construção de cercas ecológica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005, 100 p.

MELO, V. F.; VALE JÚNIOR, J. F.; UCHÔA, S. C. P., Uso e manejo dos solos sob savana. p. 131-160. In: VALE JÚNIOR, J. F.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Solos sob savanas de Roraima: gênese, classificação e relações ambientais**. Boa Vista: Gráfica Ioris, 2010. 219 p.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the *16S rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, v. 29, n. 4 , p. 315–332, 2006.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the *16S rRNA* gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 59, n.12, p. 1-17, 2009.

MOREIRA F. M. S.; HAUKKA, K.; YUONG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. **Molecular Ecology**. Oxford. v.7, n. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de 49 leguminosas arbóreas nativas da Amazônia em viveiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.21, n.4, 581-590, 1997.

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

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereinae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.

NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium spp.* In relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, p. 214-235, 1964.

OLIVEIRA JUNIOR, J. Q.; NETO, A. J.; FONSECA, E. S.; LASTE, K. C. D.; FARIA, S. M. **Estirpes de "rizóbio" indicadas para a inoculação de espécies de leguminosas florestais - aproximação 2010**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 21p. (Documento 268)

PAGANO, M. C. Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration. **Plant Soil Environment**.Praga, v. 54, n. 11, p. 498-508, 2008.

PEDREIRA, J. L.. **Uso e manejo indígena de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul. – *Fabaceae*) na terra indígena Araçá, RR**. Dissertação (Mestrado de Ciências de Florestas Tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisa Amazônicas – INPA, Manaus, 2010.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. de O.; CAMPO, R. J.; TARRES E. Variação qualitativa e quantitativa na microbiota do solo e na fixaçãobiológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1397-1412, 2007.

PIRIE, M. D.; KLITGAARD, B. B.; PENNINGTON, R. T. Revision and Biogeography of *Centrolobium* (*Leguminosae* - *Papilionoideae*). **Systematic Botany**, Laramie, v. 34, n. 2, p. 345–359, 2009.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R.; CAMACHO, M., RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; WILLEMS, A. and VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of**

**Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 59, n. 8, p. 1929-1934. 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 829 p.

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Ecologia, isolamento e identificação de bactérias diazotróficas. p. 258-279. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005. 368p.

RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Aplicação do método de ELISA indireto para determinação da taxa de estabelecimento de inoculante rizobiano a partir de extratos de nódulos de leguminosas. **Agronomia**, Seropédica, v.38, n.1, p. 71-77, 2004.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiol.** v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 62, n. 5, p. 1179-1184, 2012.

RIVAS, R.; WILLEMS A.; PALOMO, J. L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA E.; GILLIS, M. and VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 54, n. 4, p. 1271-1275. 2004.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analyse of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, v.32, n. 2, p.101-110, 2009.

ROSSELLÓ-MORA, R.; Amann. R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação de nódulos em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36 p. (Documentos 251).



SILVA, G. T. A., RESENDE, A. S., CAMPELLO, E. F. C., DIAS, P. F. FRANCO, A. A. **O papel de fixação biológica de nitrogênio na sustentabilidade de sistemas agroflorestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 36 p. (Documento 231).

SOUZA, L. A. G.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação de cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.24, n. 1, p. 9-18, 1994.

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**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 83-91. 2008.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman e Cia, 1973. 573 p.

STACKEBRANDT, E. Defining Taxonomic Ranks. **Prokaryotes**. v. 1, p. 29–57, 2006.

STAMFORD, N.P.; SANTOS; C.E.R.S.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 49-54, 1996.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J.. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. **Applied and environmental microbiology**, Washington. v. 71, n. 11, 7041-7052, 2005.

STRALIOTTO, R. Diversidade do rizóbio – Evolução dos estudos taxonômicos. p. 222-254. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005. 368p.

TAIZ, L, ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4 Ed., 2009.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR, S. **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. Molecular Biology and Evolution, 2011.

TAYEB, L. A.; LEFEVRE, M.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; GRIMONT, P. A. D. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. **Research in Microbiology**.v. 159, n. 3, p. 169-177, 2008.

TOLEDO, B. F.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S *rRNA*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 384-391, 2009.

TONINI, H.; ARCO-VERDE, M. F.; SCHWENGBER, D.; MOURÃO JUNIOR, M. Avaliação de espécies florestais em área de mata no estado de Roraima. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 8-18, 2006.

VALE JÚNIOR, J. F.; PARENTE JÚNIOR, W.; BENEDETTI, U. G.; SCHAEFER, C. E. G. R.; MELLO, V. F. Classificação e caracterização dos solos sob savana. Capítulo II. In: VALE JÚNIOR, J. F.; SCHAEFER, C. E. G. R. (Ed.). **Solos sob savannas de Roraima**. Boa Vista: Ioris, 2010. 219 p.

VAN BERKUM, P., LEIBOLD, J. M.; EARDLY, B. D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsh and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 207-215. 2006.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae*: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 55, n. 2, p. 569-575. 2005.

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

WANG, R.; CHANG, Y. L.; ZHENG, W. T.; ZHANG, D.; ZHANG, X. X.; SUI, X. H. WANG, E. T.; HU, J. Q.; ZHANG, L. Y.; CHEN W. X. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, 2013.(<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.10.009>).

WANG, J. Y.; WANG, R.; ZHANG, Y. M.; LIU, H. C.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov. isolated from nodules of soybean grown in Daqing City of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v.63, n. 2, p. 616-624 ,2013.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia.** Disponível em: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Acesso em: 02 jan. 2013

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**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006.

XIE, C; YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 55, n. 3, p. 1233-1237, 2005.

XU, L. M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha. v. 45, n. 4, p. 706-711, 1995.

YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v. 52, p. 2219-2230, 2002.

ZHANG, Y. M.; LI, Y. J. ; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; LI, Q. .Q, ZHANG ( Y. Z.; ZHOU, Y. G.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. **Systematic and Applied Microbiology**. Stuttgart, v. 62, n. 8, p. 1951-1957. 2012

ZILLI, J.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira.** Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 356p.

## Apêndice A – Imagens de experimentos com feijão-caupi



Figura 3 - Plantas de pau-rainha com 30 dias de cultivo em casa de vegetação para a obtenção dos nódulos.



Figura 4 - Experimento conduzido em casa de vegetação para avaliação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos obtidos de nódulos de pau-rainha (*Centrolobium paraense*) inoculados em feijão-caupi.

**Apêndice B – Tabela de protocolo de preparo da solução de Hoagland e Arnon**

**Tabela 2 - Composição da solução de Hoagland e Arnon com adaptação utilizada para irrigar os tratamentos do ensaio de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha.**

| Reagentes   | Concentração dos reagentes soluções<br>Estoque   | Volume<br>pipetado*(mL) |
|---|--|-------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$                         | 1 M  | 0,1                     |
| $\text{KNO}_3$  | 1 M  | 0,6                     |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 1 M  | 0,4                     |
| $\text{MgSO}_4$                                       | 1 M  | 2                       |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$                               | 0,5 M  | 4,5                     |
| $\text{CaHPO}_4$                                      | 0,05 M   | 10                      |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                              | 0,0025 M   | 10                      |
| Solução de<br>micronutrientes                         | (2,86 g $\text{H}_2\text{BO}_3$ ; 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,22 g<br>$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,08g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,028 g<br>$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). $\text{L}^{-1}$ | 1                       |
| $\text{Ca}_2\text{SO}_4$                              | 0,43 g. $\text{L}^{-1}$  | 800                     |
| Solução Fe-<br>EDTA                                   | (26,1 g EDTA; 89,2 ml NaOH N; 24 g<br>$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). $\text{L}^{-1}$   | 1                       |

\* Volume referente ao preparo de 4 L de solução nutritiva ¼ de força, 2 L de solução nutritiva ½ força e 1 L de solução nutritiva 1 força.

### Apêndice C – Imagem da instalação do experimento com pau-rainha



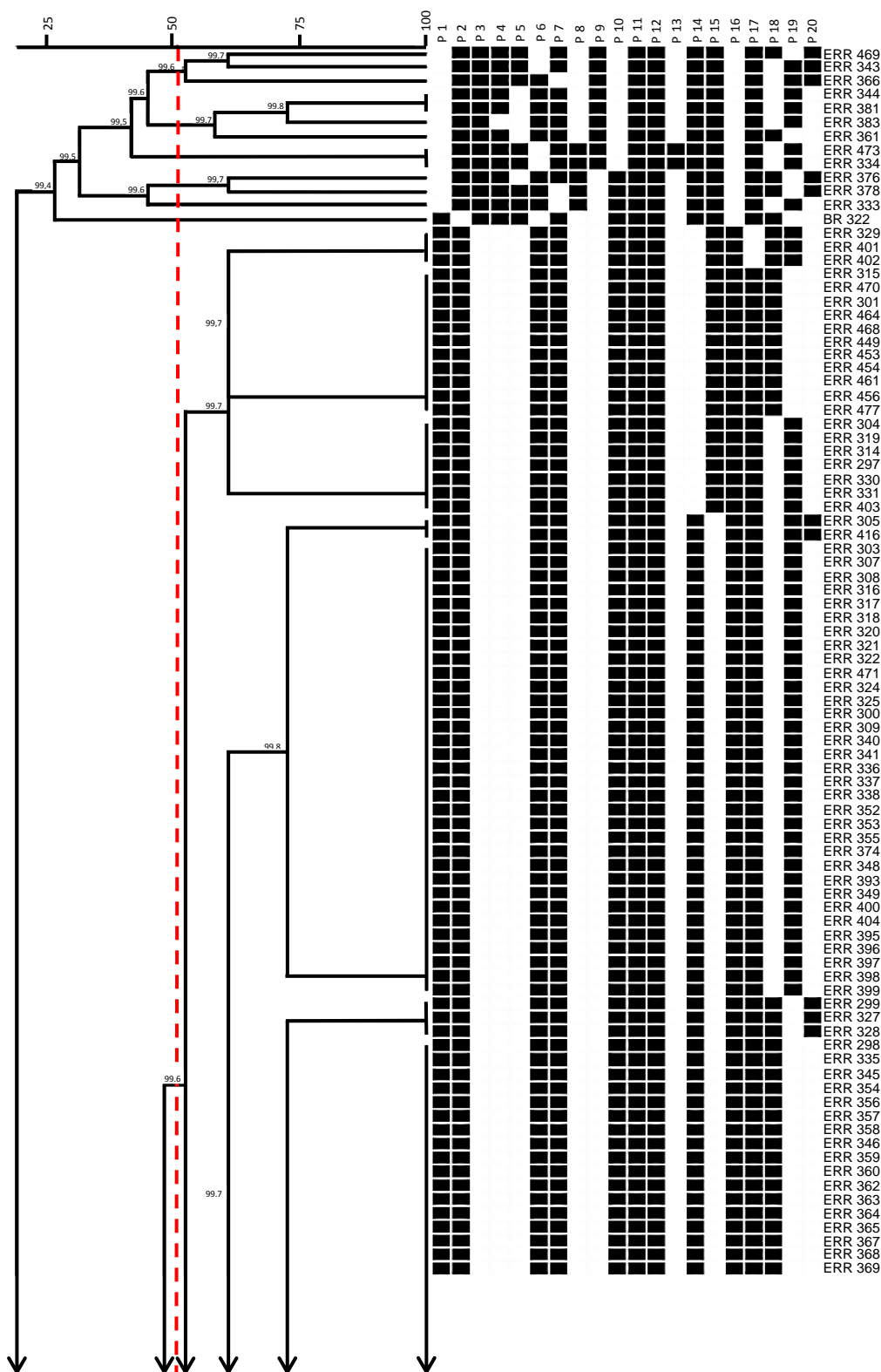
Figura 5 – Experimento em casa de vegetação para avaliar a eficiência dos isolados na promoção do crescimento de mudas de pau-rainha.

Apêndice D – Tabela com número de acesso de estirpes de referência

Tabela 4 - Sequências de estirpes depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética dos rizóbios isolados de pau-rainha.

| Espécies de referência                              | Nº de acesso no NCBI |          |          |          |          |
|---|----------------------|----------|----------|----------|----------|
|   | 16S rRNA             | recA     | glnII    | gyrB     | rpoB     |
| <i>Bradyrhizobium betae</i> (LMG 21987)             | AY372184             | FM253174 | AB353733 | FM253217 | FM253260 |
| <i>Bradyrhizobium canariense</i> (LMG 22265)        | AJ558025             | FM253177 | AY386765 | FM253220 | FM253263 |
| <i>Bradyrhizobium cytisi</i> (LMG 25866)            | EU561065             | JN186293 | JN186291 | JN186292 | JN186288 |
| <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (LMG 8443)      | X66025               | EU665419 | HM047121 | FM253239 | FM253282 |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (LMG 6134)            | U35000               | AM182155 | AY599117 | AM418800 | AM295348 |
| <i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> (LMG 26136)  | HQ231463             | HQ231595 | HQ231639 | JX437672 | HQ428068 |
| <i>Bradyrhizobium iriomotense</i> (LMG 24129)       | AB300992             | AB300996 | AB300995 | HQ873308 | HQ587646 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (LMG 6138)          | U69638               | AM168341 | AF169582 | JN685727 | AM295349 |
| <i>Bradyrhizobium jicamae</i> (LMG 24556)           | AY624134             | HQ587415 | FJ428204 | HQ873309 | HQ587647 |
| <i>Bradyrhizobium lablabi</i> (LMG 25572)           | GU433448             | GU433522 | GU433498 | JX437670 | JX437677 |
| <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> (LMG 18230)      | AF208513             | FM253180 | AY386775 | FM253223 | FM253266 |
| <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> (LMG 24246)        | AY624135             | HQ587416 | FJ428201 | HQ873310 | HQ587648 |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (CCBAU 10071)    | AF193818             | AY591566 | AY386780 | HE576508 | EF190174 |
| <i>Bradyrhizobium daqingense</i> (CCBAU15774)       | HQ231274             | HQ231270 | HQ231301 | JX437669 | JX437676 |
| <i>Bradyrhizobium arachidis</i> sp.nov. CCBAU 23155 | GU433450             | GU433524 | GU433500 | JX437671 | JX437678 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> (LMG 14904)          | -                    | AM182125 | EU155089 | AM418830 | AM295352 |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> (LMG 6465)          | X67221               | -        | -        | -        | -        |

## Apêndice E – Dendrograma de similaridade fenotípica





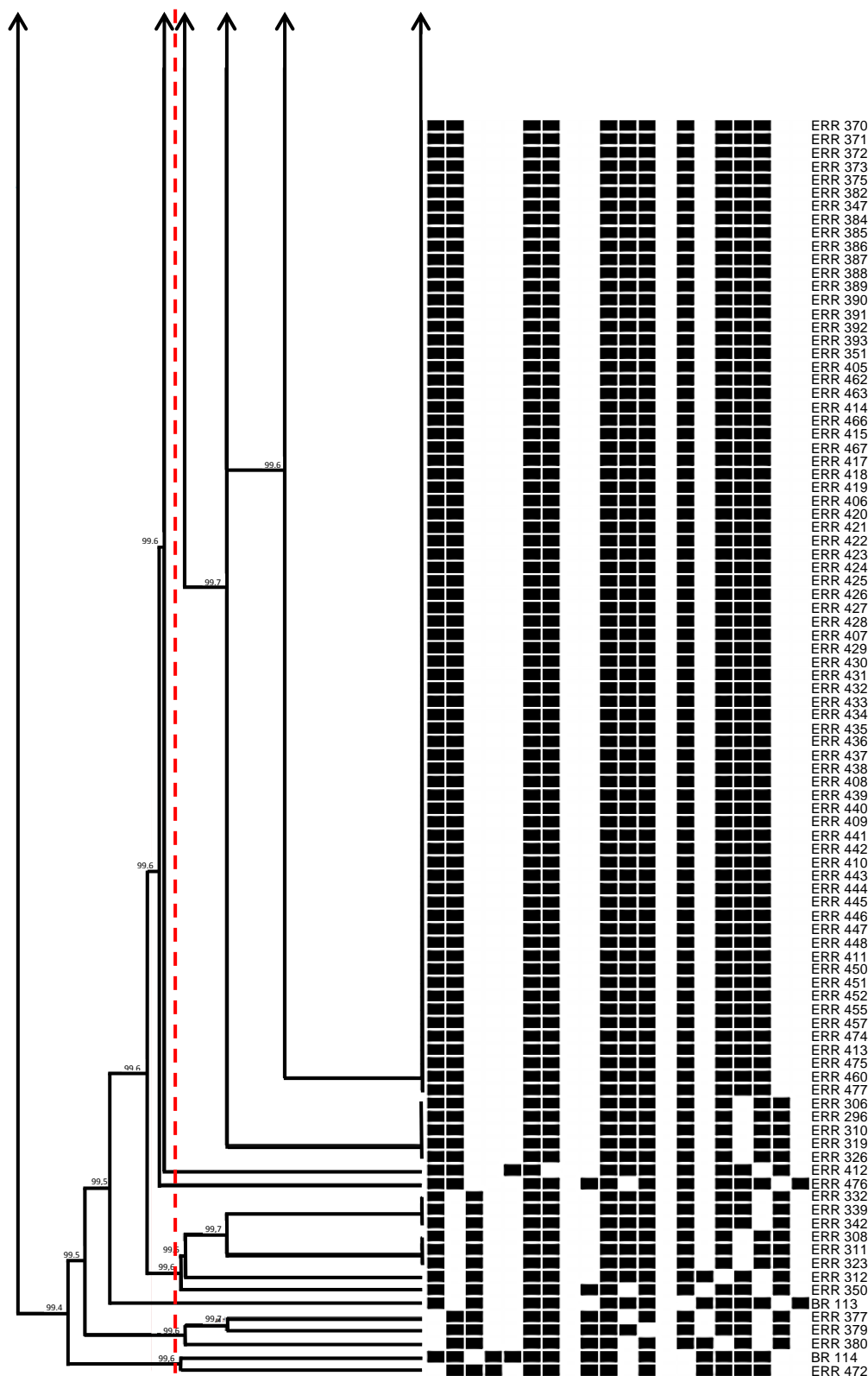


Figura 7 - Dendrograma dos 178 isolados bacterianos oriundos de nódulos de *Centrolobium paraense* gerado a partir de uma matriz binária e agrupado pelo método UPGMA. Quadrados cheios = ausência da característica; quadrados vazios = presença da característica. P1 = crescimento rápido, P2 = crescimento intermediário, P3 = crescimento lento, P4 = pH alcalino; pH ácido, P5 = colônias pequenas, P6 = colônias médias, P7 = colônias grandes, P8 = colônias circular; colônia irregular, P9 = colônia plana, P10 = colônia convexa, P11 = colônia elevada, P12 = colônia côncava, P13 = borda lisa; ondulada, P14 = pouco muco, P15 = muco moderado, P16 = muco abundante; P17 = muco transparente, P18 = muco translúcido, P19 = muco opaco, P 20= muco homogêneo; muco heterogêneo.

## Apêndice F – Fotografias de géis de agarose

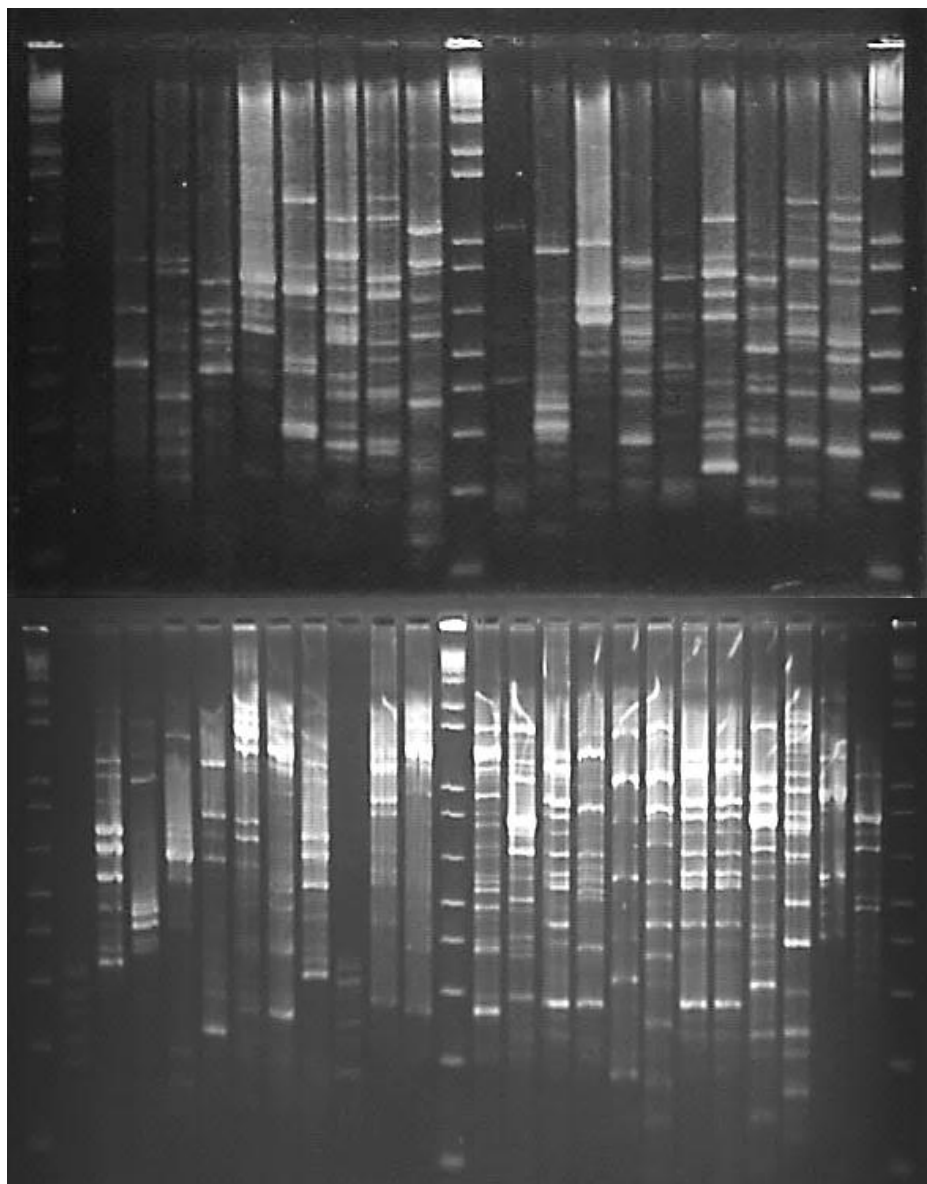


Figura 8 - Géis de agarose mostrando fragmentos Box amplificados dos rizóbios isolados de nódulos de *C. paraense*.

### Apêndice G – tabelas de correlação entre parâmetro de FBN

**Tabela 6 - Coeficiente de correlação entre os parâmetros utilizados para avaliação da FBN de rizóbios inoculados em pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.)**

| Parâmetros | AP     | DC     | AF     | NF     | MSPA   | MSR    | NT     | NN     | MSN |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| AP         | 1      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -   |
| DC         | 0,4378 | 1      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -   |
| AF         | 0,7471 | 0,6783 | 1      | -      | -      | -      | -      | -      | -   |
| NF         | 0,7013 | 0,3545 | 0,7686 | 1      | -      | -      | -      | -      | -   |
| MSPA       | 0,6746 | 0,8019 | 0,9264 | 0,665  | 1      | -      | -      | -      | -   |
| MSR        | 0,4831 | 0,814  | 0,7929 | 0,5036 | 0,9361 | 1      | -      | -      | -   |
| -          | 0,7188 | 0,6439 | 0,9404 | 0,7632 | 0,9395 | 0,8153 | 1      | -      | -   |
| NN         | 0,5632 | 0,2826 | 0,623  | 0,5501 | 0,4452 | 0,3149 | 0,5481 | 1      | -   |
| MSN        | 0,655  | 0,5125 | 0,7602 | 0,6032 | 0,6836 | 0,5686 | 0,7268 | 0,7875 | 1   |

AP: Altura da Planta; DC: Diâmetro do Colo; AF: Área Foliar; NF: número de Folíolos; MSPA: Matéria seca da parte aérea; MSR: Matéria seca de raiz; NT: Nitrogênio Total; NN: número de nódulos; MSN: Matéria seca de nódulos.

## Apêndice H – Fotografias do experimento de eficiência da FBN em pau-rainha



Figura 11 - Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha (*C. paraense*). Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estirpe eficiente (ERR 326)



Figura 12 - Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha (*C. paraense*). Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estirpe de referência BR 114 (*B. japonicum*).



Figura 13 - Resultados de eficiência dos rizóbios em mudas de pau-rainha (*C. paraense*). Da esquerda para direita: Controle; Tratamento nitrogenado; Controle; Tratamento nitrogenado; Tratamento inoculado com estipe pouco eficiente (ERR 305).