



KATIA PEREIRA COELHO

**SIMBIOSES DE RIZÓBIOS COM
LEGUMINOSAS ARBÓREAS NA PRÉ-
AMAZÔNIA MARANHENSE**

LAVRAS – MG

2016

KATIA PEREIRA COELHO

**SIMBIOSES DE RIZÓBIOS COM LEGUMINOSAS ARBÓREAS NA
PRÉ-AMAZÔNIA MARANHENSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Phd. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dra. Paula Rose de Almeida Ribeiro

Coorientadora

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Coelho, Katia Pereira.

Simbioses de rizóbios com leguminosas arbóreas na pré-amazônia
maranhense / Katia Pereira Coelho. – Lavras : UFLA, 2016.
143 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.
Orientadora: Fatima Maria de Souza Moreira.
Bibliografia.

1. *Leguminosae*. 2. Sistema de cultivo em aléias. 3.
Bradyrhizobium. 4. *Mesorhizobium*. 5. *Rizobium*. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

KATIA PEREIRA COELHO

**SIMBIOSES DE RIZÓBIOS COM LEGUMINOSAS ARBÓREAS NA
PRÉ-AMAZÔNIA MARANHENSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de abril de 2016.

Dra. Paula Rose de Almeida Ribeiro	UFLA
Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega	UFRB
Prof. Dr. Rubens Manoel dos Santos	UFLA
Dr. Ederson da Conceição Jesus	EMBRAPA Agrobiologia

Profa. PhD. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

LAVRAS – MG

2016

Ao Manoel Venceslau, meu avô (*In memoriam*), cuja simplicidade e amor ensinaram que a vida pode ser digna mesmo diante de muitas dificuldades.

À minha mãe, Janete Vanda P. Coelho, meu exemplo de vida, de guerreira, de mãe e meu pilar de sustentação.

À minha segunda mãe, Maria Augusta, que, na simplicidade, expressa seu amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Cassius, Cassia e Kallynadjá que estão sempre ao meu lado como anjos protetores e amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada é possível.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro e à FAPEMA pela bolsa de doutorado.

À minha família pelo apoio, força e incentivo, especialmente, às minhas duas mães, Janete e Maria Augusta, e a meus irmãos, Cassius, Kallynadjá e Cassia, principalmente, à Cassia, pelo apoio e companhia constantes.

À Universidade Federal de Lavras, aos meus professores e, em especial, à minha orientadora, Prof. Dra. Fatima Maria de S. Moreira que, mesmo diante das dificuldades, continuou acreditando em mim.

Ao meu namorado Rodrigo Vargas e sua família por estarem sempre ao meu lado, nesta caminhada, apoiando-me e incentivando-me.

À minha amiga e parceira de trabalho, Dr. Paula R. de A. Ribeiro, que me deu força, sustentação e auxiliou nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Carlos Bucher pela companhia e apoio.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, Rayssa, Elaine, Jessé, Patricia, Leonardo, Jacqueline, Wesley, Amanda, Fernanda, Márcia e todos os outros pela companhia e momentos de alegria.

Aos amigos que ajudaram ou me apoiaram de alguma maneira, especialmente à Tércia, Luiziene, Cristiane Vargas, Cristiane Freitas e Dr. Orlando Huertas.

Aos técnicos do laboratório, Marlene e Manoel, pelo apoio constante.

À Profa. Dra. Antonia Alice e à equipe do laboratório de fitopatologia do NTER, da UEMA, pelo auxílio na parte de isolamento no Maranhão.

Aos Professores, Emanuel Gomes de Moura e Alana das Chagas F. Aguiar, pelo apoio, ajuda no trabalho e pelos longos anos de parceria e convivência.

Ao Vinícius Macedo do PPG em Agroecologia e aos alunos da UFMA-campus Chapadinha pela ajuda na coleta de amostras.

Às minhas psicólogas Adriana Elieser e Renata Araújo e aos médicos Luiz Carlos M. R. Ramalho e Antônio Pádua Saldanha pelo auxílio nos momentos difíceis.

*Os grandes feitos são conseguidos não pela
força, mas pela perseverança.*

Samuel Johnson

RESUMO GERAL

As leguminosas arbóreas gliricídia (*Gliricidia sepium*), sombreiro (*Clitoria fairchildiana*), leucena (*Leucaena leucocephala*) e acácia (*Acacia mangium*) têm sido indicadas para sistemas agroflorestais, recuperação de áreas degradadas, reflorestamento e outros fins no trópico úmido. Apesar da importância dessas leguminosas, a região da pré-Amazônia maranhense é carente de informações acerca da capacidade simbiótica e diversidade de populações indígenas de rizóbios dessas leguminosas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genética de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de gliricídia, sombreiro, leucena e acácia, na região da pré-Amazônia maranhense e autenticar as estirpes isoladas destas espécies em siratro (*Macropodium atropurpureum*). A amostragem foi realizada em um sistema de cultivo em aléias, amostraram-se 20 plantas de cada espécie (leucena, acácia, sombreiro e gliricídia), coletando-se 10 nódulos por planta. Foi feito isolamento, caracterização cultural, sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise da capacidade simbiótica das estirpes bacterianas com siratro. Foram instalados dois experimentos, para a autenticação das estirpes, realizados em duas etapas, em casa de vegetação. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os experimentos foram conduzidos em garrafas tipo *long-neck* (500 ml), preenchidas com solução nutritiva de Hoagland estéril. Gliricídia, sombreiro, leucena e acácia são colonizadas por grupos de rizóbios distintos. Gliricídia nodula, preferencialmente, com o gênero *Rhizobium*, sombreiro e acácia nodulam, preferencialmente, com o gênero *Bradyrhizobium* e leucena tem *Mesorhizobium* como principal simbiote. Estirpes endofíticas de dez gêneros foram encontradas, colonizando os nódulos de gliricídia, sombreiro, leucena e acácia e uma estirpe do gênero *Arthrobacter* apresentou nodulação positiva em siratro. Estirpes do gênero *Terriglobus* tiveram seu primeiro relato de capacidade endofítica. Este é o primeiro relato de isolamento de *Methylobacterium* sp. de nódulos de gliricídia. Estirpes indígenas da pré-amazônia maranhense dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* nodulam com siratro, mas são ineficientes ou pouco eficientes em promover o seu crescimento.

Palavras-chave: *Leguminosae*. Sistema de cultivo em aléias. *Bradyrhizobium*. *Mesorhizobium*. *Rhizobium*.

GENERAL ABSTRACT

The tree leguminous gliricídia (*Gliricidia sepium*), acácia (*Acacia mangium*), leucena (*Leucaena leucocephala*) and sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) are indicated for agroforestry systems, reclamation of degraded lands, reforestation and other purposes in the wet tropic. Despite the importance of legumes the pre-amazon region it is lacking in information about the symbiotic capacity and diversity of indigenous rhizobia of these legumes. The aim of this work was to evaluate the phenotypic and genetic diversity of rhizobia species nodulating gliricidia sombreiro, leucena and acacia in the Maranhão pre-Amazon region and authenticate isolates of these species in siratro (*Macroptilium atropurpureum*). For this they were installed two experiments. Sampling was carried out on a alley cropping system, was sampled 20 plants of each species by collecting 10 nodules per plant. It was made isolation, cultural characterization, partial 16S rRNA gene sequencing and analysis of the symbiotic ability of bacterial strains with siratro. The authentication experiment was done in two steps for each legume (gliricidia, acácia, sombreiro and leucena), in the greenhouse and in a completely randomized design with three replications with sterile Hoagland nutrient solution as substrate. Gliricídia, Sombreiro, leucena and acacia are colonized by distinct groups of rhizobia. Gliricidia nodulate preferably with *Rhizobium*, sombreiro and acacia nodulate preferably with *Bradyrhizobium* and leucena has *Mesorhizobium* main symbiote. Endophytic strains of ten genera were found colonizing the gliricidia, sombrero, leucena and acacia nodules and a strain of *Arthrobacter* sp. had a positive nodulation with siratro. This is the first report on isolation of *Methylobacterium* sp. in gliricidia nodules and endophytic ability of *Terriglobus* sp. strains. Indigenous strains of pre-Amazon region of *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium* genus nodulate with siratro, but are ineficiente or had low efficiency to promote their growth.

Key words: Leguminosae. Alley cropping system. *Bradyrhizobium*. *Mesorhizobium*. *Rhizobium*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

- Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões.45
- Quadro 2 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Acacia mangium* em diversas regiões.51
- Quadro 3 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Gliricidia sepium* em diversas regiões.....56
- Quadro 4 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Clitoria fairchildiana* em diversas regiões.....59

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

- Figure 1.** Location and sketch of the sampled experimental area. Different colors indicate legumes which make up the alley cropping system. In all the plots, legume trees are intercropped with corn and mulato grass; in the plot without legume, only corn and grass are cultivated. For this study, only gliricidia and sombreiro were sampled. Black dots are georeferenced and indicate the points where the soil samples are collected.97
- Figure 2.** Phenotypic characteristics of strains isolated from nodules of *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region of

Maranhão. The following characteristics were analyzed: time of appearance of isolated colonies (R - fast: 1 to 3 days; I - Intermediate: 4 to 5 days; S - slow: 6 to 10 days); and pH of the reaction in medium 79 with bromothymol blue (AC-acid, N-neutral, AL-alkaline).98

ARTIGO 2

Figura 1. Localização e croqui da área experimental amostrada. As diferentes cores indicam as leguminosas quem compõe o sistema de aléias. Em todas as parcelas as leguminosas arbóreas são consorciadas com milho e capim mulato, na parcela sem leguminosa apenas o milho e o capim são cultivados. Para este estudo foram amostradas apenas as leguminosas leucena e acácia. Os pontos pretos são georreferenciados e indicam pontos onde são coletadas amostras de solo. 132

Figura 2. Distribuição das estirpes isoladas de nódulos de *Acacia mangium* e *Leucaena leucocephala*, cultivadas em um sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense, de acordo com os grupos fenótipos obtidos. As características fenotípicas observadas foram: tempo de surgimento de colônias isoladas (R - rápido: 1 a 3 dias; I - intermediário: 4 a 5 dias; L - lento: 6 a 10 dias); e reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol (AC-ácido; N-neutro; AL-alcalino). 133

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1. Culture, identification based on 16S rRNA gene partial sequencing, and mean values of shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), root and shoot ratio (R/S), relative efficiency to the controls with high mineral N concentration (RENC), nodules dry matter (NDM), and number of nodules (NN) of bacterial strains isolated from *Gliricidia sepium* nodules cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region of Maranhão, and authenticated regarding nodulation in *Macropitilium atropurpureum*. Two non-inoculated controls, one with high mineral N concentration (52.5 mg L^{-1}), and one with low mineral N concentration (5.25 mg L^{-1}), and two inoculated controls (UFLA 04-212 and SEMIA 656). Experiment divided into two stages. The sequences of the strains were compared based on the most similar sequences found in the GenBank.....99

Table 2. Culture, identification based on 16S rRNA gene partial sequencing and mean values of shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), root and shoot ratio (R/S), relative efficiency to the controls with high mineral N concentration (RENC), nodules dry matter (NDM), and number of nodules (NN) of bacterial strains isolated from *Clitoria fairchildiana* nodules cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region, and authenticated regarding nodulation in *Macropitilium atropurpureum*. Sequences of the strains were

compared based on the most similar sequences found in the GenBank. 101

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e parâmetros de crescimento, eficiência e nodulação em *Macropodium atropurpureum* inoculado com estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Leucaena leucocephala* coletados em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank. 134
- Tabela 2 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de *M. atropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Leucaena leucocephala* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da 2º etapa (Experimento conduzido em duas etapas). 136
- Tabela 3 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de *M. atropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Leucaena leucocephala* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da 1º etapa de um experimento conduzido em duas etapas. 137
- Tabela 4 - Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e parâmetros de crescimento, eficiência e nodulação em *Macropodium atropurpureum* de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de

	<i>Acacia mangium</i> coletados em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.	138
Tabela 5 -	Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de <i>M. artropurpureum</i> inoculada com estirpes indígenas isoladas de <i>Acacia mangium</i> em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da primeira etapa de um experimento conduzido em duas etapas.	140
Tabela 6 -	Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de <i>M. artropurpureum</i> inoculada com estirpes indígenas isoladas de <i>Acacia mangium</i> em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da segunda etapa de um experimento conduzido em duas etapas.....	141
Tabela 7 -	Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de <i>M. artropurpureum</i> inoculada com estirpes indígenas isoladas de <i>Acacia mangium</i> em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da primeira etapa de um experimento conduzido em duas etapas.....	142
Tabela 8 -	Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de <i>M. artropurpureum</i> inoculada com estirpes indígenas isoladas de <i>Acacia mangium</i> em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da segunda etapa de um experimento conduzido em duas etapas.....	143

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Nitrogênio no trópico úmido	21
2.2	FBN e os gêneros de rizóbios	22
2.2.1	Definição e conceitos básicos sobre fixação biológica de nitrogênio	23
2.2.2	Nodulação e FBN na simbiose rizóbio-leguminosa	25
2.2.3	Diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas, comunidades indígenas e especificidade rizóbio-hospedeiro	26
2.2.4	Identificação de estirpes bacterianas: sequenciamento do gene 16S rRNA e caracterização fenotípica	27
2.2.5	Gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas de α-proteobactérias e β-proteobactérias	30
2.3	A família <i>Leguminosae</i> (<i>Fabaceae</i>)	39
2.4	Importância do uso de leguminosas arbóreas no trópico úmido	40
2.4.1	Leguminosas arbóreas: utilização na região tropical úmida (periferia da Amazônia)	41
2.4.2	Escolha de leguminosas arbóreas para sistemas agroflorestais ou recuperação de áreas degradadas no trópico úmido	42
2.4.3	Leucena: características, uso e fixação biológica de nitrogênio	43
2.4.4	Acácia: características, uso e fixação biológica de nitrogênio	49
2.4.5	Glicídia: características, uso e fixação biológica de nitrogênio	54
2.4.6	Sombreiro: características, uso e fixação biológica de nitrogênio ...	58
3	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	79
	ARTIGO 1 - Symbiosis of rhizobia with <i>Clitoria fairchildiana</i> and <i>Gliciridia sepium</i> in oxisol in the pre-Amazon region of Maranhão	79
	ARTIGO 2 - Simbioses de rizóbios com <i>Acacia mangium</i> e <i>Leucaena leucocephala</i> na Pré-Amazônia maranhense	103

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A pré-Amazônia é localizada no trópico úmido e consiste na área de entorno da Amazônia legal. Essa região merece atenção especial na conservação visto o uso insustentável do solo da área desmatada na fronteira amazônica constituir uma das maiores ameaças para a floresta (MOURA et al., 2013). As condições edafoclimáticas tornam essa região desafiadora para a agricultura e o uso de sistemas agroflorestais com leguminosas arbóreas tem sido indicado, principalmente, para pequenos agricultores (AGUIAR et al., 2010). O uso de leguminosas arbóreas é vantajoso, pois são culturas perenes e capazes de estabelecer simbiose com bactérias que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), consistindo numa importante via de aporte desse nutriente. O nitrogênio apresenta disponibilidade crítica, em solos tropicais, devido à dificuldade de acúmulo de matéria orgânica e a alta taxa de perdas, principalmente, por lixiviação devido a elevadas precipitações (CHRISTESEN, 2000). Neste cenário, leguminosas arbóreas de crescimento rápido, alta produção de biomassa e capacidade de resistir aos longos períodos de estiagem, existentes em algumas regiões dos trópicos, são desejáveis. Entre as leguminosas utilizadas, nessa região, estão a acácia (*Acacia mangium*), a leucena (*Leucaena leucocephala*), o sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) e a gliricídia (*Gliricidia sepium*) (AGUIAR et al., 2010; MOURA et al., 2013).

A acácia é uma leguminosa arbórea, da subfamília *Mimosoideae*, nativa da Austrália, Papua Nova Guiné e leste da Indonésia que possui elevada rusticidade, adaptação a condições ambientais adversas e elevada produção de biomassa (ROSSI; AZEVEDO; SOUZA, 2003; SCHIAVO; MARTINS, 2003). Leucena tem origem nas Américas e, atualmente, é amplamente distribuída, inclusive, em outros continentes como Austrália, Ásia e África. É uma árvore de

crescimento rápido que possui elevado teor de nitrogênio nas folhas, alta produção de biomassa e é utilizada em diversas funções, pertence à subfamília *Mimosoideae* (KANG; REYNOLDS; ATTA-KRAH, 1990; SHELTON; BREWBAKER, 1994; TIAN; KANG; BRUSSAARD, 1992). Gliricídia e sombreiro pertencem à subfamília *Papilionoideae*. Gliricídia tem como área de distribuição natural a Mesoamérica e apresenta características que permitem uma elevada multiplicidade de uso, já o sombreiro é nativo do Brasil e ocorre, principalmente, na Floresta Ombrófila Densa na Amazônia e em formações secundárias (DUCKE, 1949; SIMONS; STEWART, 1994). A capacidade de FBN, dessas leguminosas, certamente, é o fator mais relevante para a escolha dessas leguminosas, para uso em sistemas agroflorestais e em recuperação de áreas degradadas na periferia da Amazônia.

A fixação biológica de nitrogênio consiste na conversão do nitrogênio atmosférico, presente numa forma indisponível para as plantas, em amônia e pode ser realizada por bactérias de vida livre, associativas ou simbióticas. Na FBN simbiótica, ocorre a interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), também denominados rizóbios, com espécies de leguminosas e *Parasponia* spp. e na simbiose de *Frankia*. Essa simbiose é eficiente apenas com a interação adequada entre a planta, a bactéria e o ambiente. Os solos brasileiros apresentam alta diversidade de rizóbios (GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2009; MARRA et al., 2012; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998). Além disso, poucos estudos têm sido conduzidos para investigar a diversidade e capacidade simbiótica de BFNN de leucena, acácia, sombreiro e gliricídia na região pré-amazônica maranhense, mesmo considerando o grande potencial destas leguminosas (COELHO, 2010; GUALTER et al., 2011; SILVA JÚNIOR, 2009). Estudos desse tipo são importantes à medida que podem servir para indicar a necessidade de inoculação e são a base para a busca de novas estirpes de rizóbio capazes de serem

utilizadas como inoculantes. Em virtude do exposto este trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas de nódulos de acácia, leucena, sombreiro e gliricídia na região da pré-Amazônia maranhense, e sua capacidade simbiótica e eficiência com plantas de siratro (*Macroptilim atropurpureum*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nitrogênio no trópico úmido

O nitrogênio é constituinte fundamental de várias estruturas biológicas importantes como aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas e, por isso, é um dos elementos absorvidos em maior quantidade pelas plantas. Além disso, o nitrogênio é o elemento mais limitante para os vegetais, principalmente, pelo fato da maior parte encontrar-se na forma de N_2 na atmosfera, uma forma indisponível para a maioria dos seres vivos. A maior fração disponível do nitrogênio do solo está na matéria orgânica, o que faz com que uma limitação maior ocorra no trópico úmido, que inclui a periferia da Amazônia, em virtude de condições edafoclimáticas típicas da região.

No trópico úmido, a deficiência de nitrogênio é geral, especialmente, nos solos ácidos e deficiências de nutrientes, tais como P, K, Ca, Mg, B e outros são comuns (CAMPBELL; MYERS; CURTIN, 1995). Isso é resultado da combinação de solos derivados de rochas sedimentares, comuns na região e altas temperaturas e precipitações, pois combinados esses fatores produzem solos pobres e aumentam a rápida decomposição da matéria orgânica e as perdas de nitrogênio por lixiviação, desnitrificação e escoamento superficial (AGUIAR et al., 2010; CAMPBELL; MYERS; CURTIN, 1995). Esses problemas nutricionais poderiam ser resolvidos com o uso de fertilizantes, entretanto essa solução é dificultada por dois fatores: a condição socioeconômica da maioria dos produtores dessa região que, por serem agricultores de subsistência, normalmente, não têm recursos para a compra de fertilizantes, e a baixa eficiência de uso dos fertilizantes (MOURA et al., 2013).

A diminuição da eficiência de uso do nitrogênio ocorre, principalmente, em decorrência da maior perda do nutriente por lixiviação, durante elevadas precipitações e seu baixo aproveitamento em condições de estiagens e veranicos.

Com relação ao fósforo, o problema é sua baixa mobilidade e adsorção na argila ou em óxidos de ferro e alumínio. A argila possui cargas positivas capazes de reter o íons fosfato. Nas condições de reação ácida a moderadamente ácida, comum no trópico úmido, os óxidos de ferro e alumínio apresentam-se, preferencialmente, com cargas positivas, sendo, assim, capazes de reter, em sua superfície, vários tipos de ânions, com predomínio de íons fosfatos (VALLADARES; PEREIRA; ANJOS, 2003).

Como observado, o suprimento de nitrogênio e outros nutrientes é essencial para a garantia de produtividade e sustentabilidade nos sistemas agrícolas no trópico úmido e mais especificamente na periferia da Amazônia. Estudos têm demonstrado que, nos trópicos úmidos, adubos verdes podem ser fertilizantes substitutos, muito eficazes, além de serem capazes de fornecer cobertura do solo e aumento do teor de matéria orgânica (DIEKMANN; DE DATTA; OTTOW, 1993; MOURA et al., 2015). Foi relatada eficiência de uso de nitrogênio (EUN) por milho consorciado com leucena e gliricídia de 32% e 44%, respectivamente (CADISCH et al., 1998). Já, com arroz, foram encontradas EUN de 19%, quando consorciado com leucena e 28% com sombreiro (FERRAZ JÚNIOR, 2000). Logo, o uso de leguminosas fixadoras de nitrogênio, inclusive arbóreas, pode fornecer suprimento parcial ou total de nitrogênio, para diversas culturas no trópico úmido, sendo uma estratégia cada vez mais adotada na região.

2.2 FBN e os gêneros de rizóbios

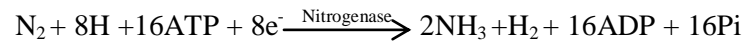
O processo de fixação biológica de nitrogênio e os organismos que executam esse processo, simbioticamente, serão vislumbrados neste tópico com ênfase nas características de cada gênero de rizóbio.

2.2.1 Definição e conceitos básicos sobre fixação biológica de nitrogênio

Depois do carbono, hidrogênio e oxigênio, o nitrogênio é o elemento mais requerido pelas plantas e, também, o mais limitante. Essa limitação ocorre em virtude da maioria do nitrogênio, cerca de 80%, se encontrarem na atmosfera em uma forma indisponível para as plantas. A maior parte do nitrogênio é disponibilizada, para as plantas, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), mas existe, ainda, a fixação por processo industrial (Haber-Bosh) e mediante descargas elétricas na atmosfera, esse último em quantidade muito baixa.

O processo de fixação de nitrogênio industrial tem alto custo tanto econômico, por necessitar de alta quantidade de energia, quanto ambiental, por gerar produtos poluentes. Em contraste à fixação biológica do nitrogênio, é um processo de baixo ou nenhum custo e não poluente. As implicações da FBN são enormes em várias frentes: nutricionalmente, a FBN contribui para a produção de sementes com alto teor de proteína, para alimentação e forragem; economicamente, os benefícios da redução do uso de fertilizantes são consideráveis; e, ambientalmente, a FBN contribui, diretamente, para a produtividade dos ecossistemas e, indiretamente, através da redução das perdas por lixiviação de fertilizantes nitrogenados (BISWAS; SCOTT; GRESSHOFF, 2011).

A FBN consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em amônia e pode ser realizada por bactérias de vida livre, associativas ou simbióticas. Na simbiose, alguns compostos são trocados entre as bactérias e plantas hospedeiras, o hospedeiro supre as bactérias com energia para seu crescimento e manutenção, além de fornecer proteção ambiental enquanto a bactéria fornece nitrogênio fixado para o hospedeiro (FISHER; NEWTON, 2002). A fixação biológica de nitrogênio é representada, em condições naturais de temperatura e pressão, pela equação:



A FBN é mediada pela enzima nitrogenase, uma metaloenzima complexa, com características estruturais e mecânicas bem conservadas. Essa enzima é formada por dois componentes, um menor denominado ferro-proteína e outro maior a ferro-molibdênio proteína, que contém o local catalítico da enzima. Todos os diazotróficos têm um sistema de nitrogenase ferro-molibdênio, mas, em caso de esgotamento de molibdênio, alguns organismos podem sintetizar nitrogenases alternativas que contenham vanádio-ferro ou ferro-ferro cofatores (DIXON; KAHN, 2004; REES; HOWARD, 2000). Uma das características da nitrogenase é sua extrema sensibilidade ao oxigênio, isso leva os diazotróficos a desenvolverem mecanismos de proteção da enzima.

Entre as estratégias de proteção da nitrogenase estão: I-proteção respiratória; II- proteção conformacional; III-Produção de polissacarídeos extracelulares; IV-relação superfície/volume celular; V-formação de células especializadas, como heterocistos com paredes espessas que limitam a entrada de oxigênio; VI-locomção das células para sítios com baixa pressão de oxigênio; VII- (leg)-hemoglobina e nodulação. Este último é o mais evoluído dos mecanismos, ocorre na simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), os chamados rizóbios, com espécies de leguminosas e *Parasponia* spp. e na simbiose de *Frankia*. Nesta simbiose, ocorre a formação de estruturas especializadas, os nódulos, dentro dos quais a concentração de oxigênio é controlada pela leg-hemoglobina (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.2.2 Nodulação e FBN na simbiose rizóbio-leguminosa

A FBN com rizóbios envolve diversos processos como reconhecimento dos simbioses, infecção e colonização das plantas pelas bactérias, formação dos nódulos radiculares e fixação biológica de nitrogênio.

O reconhecimento dos simbioses e infecção das plantas por BFNNL inicia-se com o reconhecimento de sinais moleculares e migração das bactérias em direção às raízes. Essa migração ocorre em virtude de uma resposta quimiostática, decorrente da atração por sinalizadores, que consistem em flavonoides, betaínas e fatores de nodulação (*Nod*) secretados pelas raízes das plantas. Após a migração das bactérias, ocorre a adesão à superfície vegetal, penetração, por meio de aberturas naturais, como pelos radiculares, nectários, lenticelas, injúrias ou feridas e, por último, multiplicação no interior da planta e formação dos nódulos, nas raízes ou caule, no caso de algumas espécies (REIS; OLIVARES, 2006; TIMMERS; AURIAC; TRUCHET, 1999).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), a infecção, colonização e formação dos nódulos, via pelos radiculares, por exemplo, envolve a multiplicação das bactérias ao redor do pelo, ligação das bactérias ao pelo, encurvamento do pelo, infecção seletiva do hospedeiro, formação e crescimento do cordão de infecção e liberação das bactérias nas células do córtex, mitoses e formação dos nódulos. Finalizando todo esse processo, a fixação biológica de nitrogênio efetiva ocorre em presença da leg-hemoglobina, que tem a função de manter taxas de oxigênio adequadas tanto para o metabolismo aeróbio das bactérias quanto para a atividade da nitrogenase. O fato da FBN, nessa simbiose, ocorrer, em um local específico e em condições mais controladas, maximiza a transferência do nitrogênio fixado pelos rizóbios para a planta (FISHER; NEWTON, 2002).

2.2.3 Diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas, comunidades indígenas e especificidade rizóbio-hospedeiro

Bactérias nodulíferas são englobadas em uma diversa lista filogenética com espécies distribuídas em alphaproteobacteria e betaproteobacteria nos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Burkholderia* e *Ralstonia* além de algumas espécies em gamaproteobacteria (BENHIZIA et al., 2004; BERKUM; EARDLY, 2002; CHEN et al., 2001; CHEN; YAN; LI, 1988; DE LAJUDIE et al., 1998a; DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988; FRANK, 1989; JARVIS et al., 1997; JORDAN, 1982; RIVAS et al., 2003; SY et al., 2001; VANDAMME et al., 2002). Essa lista tende a aumentar visto a grande variedade de leguminosas e áreas pouco estudadas cujas avaliações podem contribuir para a descoberta de novas BFNNL. Além disso, técnicas genéticas e moleculares atuais fornecem eficientes meios para identificar organismos com potencial para fixar nitrogênio (VITOUSEK et al., 2013).

Rizóbios indígenas, ou nativos, são aqueles naturalmente encontrados em solos de uma determinada localidade. Essas comunidades, geralmente, apresentam estirpes com elevada diversidade e variada eficiência e são a fonte de variabilidade genética da busca por estirpes capazes de serem utilizadas como inoculantes (BALA; GILLER, 2001; LIMA et al., 2009; LINDSTRO et al., 2010; MARRA et al., 2012; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998). A grande variabilidade genética entre as estirpes de comunidades indígenas se deve, principalmente, a essas comunidades serem submetidas a numerosos estresses e interações naturais, em razão de fatores edafoclimáticos. Entretanto, deve-se enfatizar que os genes que regulam a FBN são altamente conservados nos organismos que a expressam, logo, não estão sujeitos a grandes variações

(SHARMA et al., 2005; VITOUSEK et al., 2013). A eficiência das estirpes da comunidade nativa tem implicância direta na FBN com leguminosas nativas ou introduzidas em determinadas áreas. A fixação biológica de nitrogênio é determinada pela eficiência e número de rizóbios presentes no solo e influenciada pelo hospedeiro e condições ambientais (AYNABEBA et al., 2001; AMIJEE; GILLER, 1998).

A especificidade rizóbio-hospedeiro refere-se à capacidade de interação entre os simbioses. É um conceito que pode ser aplicado tanto para a bactéria quanto para a planta. Estirpes de BFNNL e leguminosas podem variar quanto à quantidade de espécies com os quais são capazes de estabelecer simbiose, sendo consideradas promíscuas, quando capazes de estabelecer simbiose com vários espécies, geralmente, uma espécie particular de rizóbio pode nodular uma taxa limitada de leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SHARMA et al., 2005). As relações simbióticas entre duas espécies e diversificação de rizóbios em características adaptativas funcionais através do gradiente ecológico pode determinar o input de nitrogênio em vários nichos ecológicos (PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000; SHARMA et al., 2005).

2.2.4 Identificação de estirpes bacterianas: sequenciamento do gene 16S

rRNA e caracterização fenotípica

Atualmente, diversas ferramentas moleculares estão à disposição para identificação e estudo da diversidade de bactérias. Entre essas técnicas, podem ser citadas as bibliotecas de clones, a hibridização fluorescente *in situ* e métodos de *fingerprinting*, como eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP). Apesar de serem metodologias distintas, todas elas utilizam, geralmente, um único gene, para diferenciar unidades operacionais taxonômicas, o gene de 16S rRNA, gene este que já se estabeleceu como o "padrão ouro", não só na

filogenia de bactérias, mas também em estudos de ecologia microbiana (CASE et al., 2007). O gene 16S rRNA é um componente da subunidade 30S dos ribossomos dos procariotos, cujas outras moléculas de RNA componentes são a 23S e a 5S. Como o 16S é o mais conservado dos rRNAs, ele é proposto como um “relógio evolucionário” capaz da reconstrução da árvore da vida (WOESE, 1987). O gene 16S é considerado um bom marcador filogenético por exibir algumas regiões conservadas, que são úteis para decifrar as relações filogenéticas, entre organismos distantes e regiões mais variáveis, que são utilizadas para diferenciar organismos estreitamente relacionados.

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma das mais importantes ferramentas na microbiologia atual e é utilizado para duas grandes funções: identificação e classificação de isolados de cultura pura e estimativa da diversidade bacteriana, em amostras ambientais, sem cultura através de abordagens metagenômicas (CASE et al., 2007). Apesar de importante os métodos moleculares não devem ser limitados unicamente ao gene 16S rRNA, visto que um consenso taxonômico é melhor alcançado quando diferentes tipos de dados e informações (fenotípica, genotípica, filogenéticos) são combinados. Esse modelo integrado denomina-se taxonomia polifásica (AZEVEDO et al., 2015). Atualmente, várias metodologias e outros genes *housekeeping* têm sido utilizados em estudos filogenéticos de bactérias, principalmente, porque existe uma limitação que o 16S rRNA apresenta para a taxonomia e filogenia de alguns gêneros, como o *Bradyrhizobium*, em que a alta conservação do gene 16S rRNA dificulta a captura da diversidade observada em outras análises fenotípicas e genotípicas e a definição das espécies (AZEVEDO et al., 2015; HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015).

A caracterização fenotípica ou morfocultural é uma técnica dependente de cultivo e consiste num método rápido e econômico que fornece informações sobre grupos de microrganismos viáveis e cultiváveis em uma amostra de solo

(LAMBAIS et al., 2005). A avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos e é muito útil, em laboratórios que não têm acesso a tecnologias sofisticadas, por ser de baixo custo (JESUS et al., 2005). Na taxonomia atual, apesar da grande valorização das técnicas moleculares, a caracterização fenotípica é empregada como parte da classificação (VANDAMME et al., 1996). O isolamento e caracterização de rizóbios de nódulos coletados em campo ou de plantas isca necessitam de poucos materiais e é realizado, segundo Vincent (1970), nas seguintes etapas: I- reidratação dos nódulos, caso estejam dessecados, em água estéril; II- desinfestação superficial dos nódulos com imersão em álcool 95%, seguida de imersão em HgCl_2 ou H_2O_2 , por tempo variado, de acordo com o produto e tamanho do nódulo e enxague em água estéril; III- esmagamento e estriamento do conteúdo interno do nódulo, em placa de petri contendo meio YMA, podendo ser adicionado ao meio azul de bromotimol.

As características mais importantes observadas são o tempo de surgimento de colônias isoladas e reação de pH em meio YMA com azul de bromotimol, mas podem ser observados, ainda, produção de exopolissacarídeos, forma, tamanho, cor, textura, consistência e detalhes ópticos da colônia (MOREIRA; PEREIRA, 2001). De acordo com essas características, Moreira e Pereira (2001) relatam os principais gêneros de rizóbios como apresentando as seguintes características: *Allorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* - colônias circulares, convexas, de 2-4 mm de diâmetro, capazes de coalescer, produtoras de exopolissacarídeos, semitranslúcida, surgimento rápido (1-3 dias), mucilaginosas e reação ácida de pH em meio YMA com azul de bromotimol. *Mesorhizobium*- as mesmas características de *Rhizobium*, mas com tempo de surgimento intermediário (4-5 dias). *Bradyrhizobium*- colônias circulares, não maiores que 1 mm de diâmetro, produção de exopolissacarídeos de abundante a

pouco, opacas, raramente translúcidas, brancas e convexas, textura granular, reação alcalina de pH e tempo de surgimento lento a muito lento (acima de 6 dias). *Azorhizobium*: colônias circulares, 0-5mm de diâmetro, coloração creme, muito pouca produção de exopolissacarídeos, reação alcalina e surgimento de rápido para intermediário (3-4 dias).

2.2.5 Gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas de α -proteobacterias e β -proteobactérias

Rhizobium

O gênero *Rhizobium* foi o primeiro gênero descrito para englobar bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas. O nome do gênero é derivado dos termos *rhiza* (raíz) e *bios* (vida) significando *Rhizobium* – que vive nas raízes, essa nomenclatura foi, originalmente, moldada pela crença de que uma classificação natural poderia basear-se na gama de especificidade simbiótica de estirpes e espécies bacterianas (YOUNG et al., 2001).

Descrito por Frank (1889) e tendo como primeira espécie *Rhizobium leguminosarum*, o gênero *Rhizobium* engloba bactérias quimio-organotróficas, com formato de bacilos, não formadoras de esporos, gram negativas, móveis por um a seis flagelos, aeróbias, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C, colônias geralmente brancas ou beges, circulares, convexas, semitranslúcidas ou opacas, mucilaginosas, com 2 a 4 mm de diâmetro, abundante produção de exopolissacarídeos, tempo de surgimento de até 3 dias e produtoras de reação ácida em meio contendo sais minerais manitol ou outros carboidratos. O gênero *Rhizobium*, atualmente, engloba cerca de 90 espécies isoladas de diversas leguminosas (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2016). Algumas estirpes apresentam eficiência comprovada e são recomendadas como inoculantes (e.g.

Rhizobium tropici para a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (BRASIL, 2011).

Bradyrhizobium

O gênero *Bradyrhizobium* foi proposto por Jordan (1982), por meio da subdivisão do gênero *Rhizobium*, em dois grupos com base no arranjo flagelar, taxa de crescimento em meio YMA, conteúdo de guanosina mais citosina do DNA e gêneros de plantas hospedeiras noduladas. O nome do gênero deriva dos prefixos *bradus* (lento) e *Rhizobium* (nome genérico bacteriano) tendo como significado rizóbio de crescimento lento. Esse gênero abrange um grupo de bactérias altamente heterogêneo, derivado de um tipo ancestral sobrevivente, que, posteriormente, deu origem às linhagens de rápido crescimento, produtoras de ácido associadas a leguminosas das zonas temperadas (JORDAN, 1982; HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). A primeira espécie descrita no gênero foi *Bradyrhizobium japonicum* (BUCHANAN, 1980) comb. nov. (Sin. *Rhizobium japonicum*). A descrição geral do gênero *Bradyrhizobium* é: bactérias gram negativas, aeróbias, não formadoras de esporos, em forma de bastões curtos, móveis por um flagelo polar ou subpolar, com crescimento lento em meio YMA, colônias menores que 1 mm de diâmetro, com 5 a 7 dias, à temperatura de 25°C a 30°C e produzem uma reação alcalina no meio de sais minerais-manitol após 28 dias a 27°C (JORDAN, 1982).

O gênero *Bradyrhizobium* é, atualmente, composto por 32 espécies (NCBI, 2016). Esse gênero abrange importantes estirpes, como as indicadas como inoculantes para soja (*Glycine max* (L.) Merr.), por exemplo, e consiste num gênero abundante e diverso nos trópicos (AZEVEDO et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2015; MOREIRA et al., 1993). Estirpes deste gênero têm sido isoladas de uma grande diversidade de leguminosas, incluindo espécies herbáceas, arbóreas e aquáticas de origem tropical ou de clima temperado, além

de serem isoladas como endofíticos em não leguminosas, essa ampla distribuição do gênero tem sido confirmada por análises ambientais metagenômicas (DELAMUTA et al., 2012; HUNGRIA et al., 2015).

Sinorhizobium/Ensifer

O Gênero *Ensifer* foi proposto, primeiramente, por Casida Junior (1982), em trabalho que descreve, além do gênero, a espécie tipo *Ensifer adhaerens*, uma bactéria do solo predadora de outras bactérias, o nome do gênero deriva do termo “sword bearer” que, em tradução livre, significa portador de espada. A proposição desse gênero com o nome *Sinorhizobium* ocorreu, em 1988 e foi o terceiro gênero incluído no grupo dos rizóbios. O nome do gênero “*Sinorhizobium*” deriva dos prefixos *sinae* (China), *rhiza* (root) e *bios* (life) tendo como significado rizóbios isolados de raízes na China. Segundo os proponentes do gênero *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1988), as bactérias, pertencentes a esse grupo, apresentam as seguintes características principais: células em formato de bastão, geralmente, contendo grânulos de poli-B-hidroxitirato, não formadoras de esporos, gram negativas, móveis por meio de um flagelo polar ou um ou mais de três flagelos peritricosos, aeróbias, possuem um tipo de metabolismo respiratório com o oxigênio como o receptor de elétrons terminal. As colônias são circulares, convexas, semitranslúcidas, elevadas, mucilaginosas, geralmente, apresentam 2 a 4 mm de diâmetro e surgem dentro de 3 a 5 dias em meio YMA. A temperatura ótima é de 25 a 30 °C e o pH ótimo de 6 a 8. Podem utilizar como únicas fontes de carbono D-arabinose, celobiose, frutose, D-galactose, glicose, L-glutamina, a lactose, D-manose, manitol, D-ribose, succinato de sódio, xilose e D-turanose.

Na ocasião da proposição do gênero, foram propostas duas espécies pela reclassificação de estirpes de *Rhizobium Fredii*, são elas *Sinorhizobium fredii* e *Sinorhizobium xinjiangensis*, esta última com nomenclatura referente à origem

dos rizóbios, a região da autônoma Xinjiang na República popular da China. Atualmente, o gênero *Sinorhizobium/Ensifer* abrange cerca de 43 espécies (NCBI, 2016).

Azorhizobium

O gênero *Azorhizobium* engloba bactérias que formam nódulos nos caules de *Sesbania* e foi proposto por Dreyfus, Garcia e Gillis (1988). O nome *Azorhizobium* deriva de *azote* (nitrogênio) e *Rhizobium* (nome genérico de bactéria) e tem como significado “rizóbios que podem usar o nitrogênio em vida livre”. Esse gênero engloba bactérias gram negativas, em formato de bastões pequenos, móveis por flagelos peritricosos e um flagelo lateral, as colônias em ágar são circulares, de cor creme, aeróbias obrigatórias, fixadoras de nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbias, com oxidase e catalase presentes e urease ausente. Entre os açúcares, apenas a glicose é oxidada. Ácidos orgânicos, tais como lactato ou succinato, são os substratos de carbono preferidos para ambos NH^+ e N dependentes para crescimento. Malonato, também, é utilizado. Amido não é hidrolisado. Pode crescer em DL-prolina. Cepas nodulam, efetivamente, as raízes e caules de *S. rostrata*. O representante da espécie é *Azorhizobium caulinodans*. Atualmente, o gênero engloba três espécies, *A. caulinodans*, *A. doebereineriae* e *A. oxalatophilum*. (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988; LANG et al., 2013; MOREIRA et al., 2006).

Mesorhizobium

O gênero *Mesorhizobium*, cuja denominação é composta por *mesos* (meio/média) e *Rhizobium* (nome genérico de bactéria) e significa “rizóbios filogeneticamente intermediários entre os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*”, foi proposto por Jarvis et al. (1997). As características das bactérias englobadas por esse gênero são: células gram negativas, aeróbias, em formato de

bastões, não formadoras de esporos, móveis, geralmente com um flagelo polar ou subpolar. As células podem conter beta-poli-hidroxibutirato. O crescimento em meio YMA produz colônias que são de 2 a 4 mm de diâmetro, após incubação, durante 3 a 7 dias a 28 °C. Todas as espécies são capazes de assimilar glicose, ramnose, sacarose e produzem ácidos. Cepas, geralmente, formam nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes de uma gama restrita de plantas leguminosas. O conteúdo de guanina mais citosina do DNA é de 59 a 64 mol% (determinado pelo método da desnaturação térmica). O representante da espécie é *Mesorhizobium loti* (JARVIS; PANKHURST; PATEL, 1982). Ao nível molecular, os membros deste gênero podem ser reconhecidos pelos seus perfis de ácidos graxos e as suas sequências de genes do 16S rRNA. Atualmente, o gênero engloba mais de 30 espécies, a última descrita até o momento foi *M. soli* (NGUYEN; KIM, 2015).

Allorhizobium

O gênero *Allorhizobium* foi proposto por De Lajudie et al. (1998a). A denominação do grupo refere-se aos termos *allos* (outros) e *Rhizobiurn* (nome genérico de bactéria) com significado de “os outros *Rhizobium*” por referir-se ao fato de que estes são, filogeneticamente, separados de outros rizóbios. Bactérias pertencentes ao gênero *Allorhizobium* são caracterizadas por serem aeróbias, com formato de bacilos, gram negativas, não formadoras de esporos, com crescimento rápido de colônias (de 1 a 2 dias em meio YMA), quimio-organotróficas, utilizando uma ampla gama de hidratos de carbono, ácidos orgânicos e aminoácidos como únicas fontes de carbono para o crescimento, produção de polissacarídeo extracelular. Os organismos são tipicamente capazes de invadir as raízes de algumas leguminosas e induzirem a formação de nódulos radiculares em que ocorrem como simbioses intracelulares. O teor de G + C do DNA é 60,1 mol. A espécie tipo é *Azorhizobium undicola*. Ao nível molecular, o

gênero pode ser reconhecido por análise de proteínas totais da célula SDS-PAGE, sequenciamento do gene 16S rRNA e ITS PCR-RFLP (DE LAJUDIE et al., 1998a).

Ralstonia

O gênero *Ralstonia* foi proposto, em 1995, pela transferência de espécies de *Burkholderia* e *Alcaligenes* para o novo gênero *Ralstonia* com a proposição das espécies *R. pickettii*, *R. solanacearum* e *R. eutropha*. O nome *Ralstonia* foi sugerido em homenagem a E. Ralston, bacteriologista americano que primeiro descreveu *Pseudomonas pickettii* e sugeriu um relacionamento taxonômico para *P. solanacearum* com base em homologia DNA entre eles (YABUUCHI et al., 1995). Desde a proposição do gênero, várias outras espécies isoladas de fontes clínicas, ambientais e humanas têm sido descritas, incluindo espécies fitopatogênicas e patógenos humanos.

O gênero *Ralstonia* é caracterizado por englobar bactérias com as seguintes características: células em forma de bastões, gram negativas, móveis com único flagelo polar ou peritricosos ou não móveis, sem flagelos, capazes de oxidar e assimilar monossacáridos, dissacáridos e poliálcoois como uma única fonte de carbono e energia. A ausência de assimilação de galactose, manitol, manose, sorbitol e pela estirpe de tipo de três espécies de *Ralstonia* é um marcador fenotípico diferencial para distinguir estirpes de *Ralstonia* sp. das de espécies *Burkholderia*. Lípidos celulares das estirpes tipo, de três espécies de *Ralstonia*, contêm ácidos graxos possuindo fosfatidiletanolamina 2-hidroxi, na posição da porção glicerol, semelhantes às das espécies de *Burkholderia*.

A proposição da espécie *R. taiwanensis*, utilizando oito isolados de nódulos radiculares de espécies de *Mimosa* e um isolado de expectoração de um doente de fibrose cística, incluiu estirpes nodulíferas de leguminosas no gênero

Ralstonia e consiste na primeira espécie de β -proteobacteria capaz de formar nódulos e fixar nitrogênio com leguminosas (CHEN et al., 2001).

Burkholderia

O gênero *Burkholderia* engloba β -proteobacterias com as seguintes características: células não fermentativas, em formato de bastões, gram negativas, com um único flagelo polar ou um tufo de flagelos polares quando móveis. Uma única espécie, *B. mallei*, é atrichous e não móvel. A catalase é produzida, a atividade de oxidase é variável por espécies. Além de monossacáridos, dissacáridos e de poliálcoois são oxidados e assimilados como única fonte de carbono e energia. Lípidos celulares são caracterizados pela presença de fosfatidilglicerol, possuindo ácido graxo hidroxilado, na posição 2 do glicerol. Algumas espécies são patogênicas de humanos, animais ou plantas. O teor de guanina mais citosina do DNA foi de 64,0-68,3 mol%. A espécie tipo é *Burkholderia cepacia* (YABUUCHI et al., 1992).

O nome do gênero é uma homenagem a WH Burkholder, o bacteriologista americano que descobriu o agente etiológico da podridão da cebola. O primeiro relato e proposição de espécies fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas no gênero *Burkholderia* foi feita por Vandamme et al. (2002) com a proposição de duas novas espécies *Burkholderia tuberum* e *Burkholderia phymatum*, ambas nodulíferas de leguminosas tropicais.

Devosia

O gênero *Devosia* pertence à família *Hyphomicrobiaceae* e à ordem *Rhizobiales* das α -Proteobacterias e foi proposto por Nakagawa, Sakane e Yokota (1996). O nome do gênero foi dado em homenagem ao microbiologista belga Paul De Vos. A proposição do gênero foi feita para incluir uma estirpe, previamente, identificada como *Pseudomonas riboflavina*. A presença de ácidos

graxos longos 3-OH C24:1 e 3-OH C26:1 foi considerada uma importante característica do gênero. A inserção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas ocorreu recentemente com a proposição da espécie *Devosia neptuniae* isolada de nódulos da leguminosa aquática *Neptunia natans* (RIVAS et al., 2003).

Methylobacterium

O gênero *Methylobacterium* engloba bactérias facultativas que utilizam metano. O nome do gênero deriva dos termos *metil* (referindo-se ao radical metil), *bakterion* (pequeno bastão). O representante da espécie de *M. organophilum* (PATT; COLE; HANSON, 1976).

Methylobacterium nodulans consiste numa espécie nodulífera de leguminosas, proposta por Sy et al. (2001), que engloba estirpes isoladas de *Crotalaria* spp. Essa espécie é a única, até o momento, dentro do gênero *Methylobacterium*, que apresenta capacidade simbiótica com leguminosas. O nome “*nodulans*” refere-se a sua capacidade de nodular.

Blastobacter

O gênero *Blastobacter* foi proposto para incluir bactérias em forma de bastonete, observadas em um papel filtro, com água enriquecida com ferro reduzido de um riacho de floresta do norte da Rússia. O representante deste gênero é a espécie tipo *Blastobacter tienricii*, nomeada em homenagem ao microbiologista americano A. T. Henrici, que tinha observado e descrito tipos morfológicos semelhantes em lagoas de água doce (ZAVARZIN, 1961). Relato de fixação de nitrogênio, em simbiose com leguminosa, foi feito por Berkum e Eardly (2002) com *B. denitrificans* e *Aeschynomene indica*.

Cupriavidus

O gênero *Cupriavidus* tem denominação derivada dos termos *Cuprum* (cobre) e *Avidus* (ansioso para amar) e significa Cupriavidus: amante de cobre. Esse gênero engloba bactérias pertencentes à β -proteobacteria em formato de hastas cocoides, gram negativas, móveis por 2-10 flagelos peritricosos, quimioheterotróficas, que não necessitam, obrigatoriamente, de fontes de nitrogênio orgânico, apresentam metabolismo oxidativo com frutose, tem oxidase e catalase positivas, são redutoras de nitrato. Essas bactérias utilizam vários aminoácidos, exceto L-isina e L-metionina, como única fonte de carbono e de azoto para o crescimento. Temperatura ideal é de 27 °C. pH ótimo é de 7,0 a 8,0, resistente a cobre. A iniciação do crescimento é estimulada pelo cobre. Colônias em ágar nutriente surgem, após 2 dias, a 27 °C e são brancas, brilhantes, mucosas, lisas e convexas, têm borda inteira, medem 2 a 4 mm de diâmetro, estirpes isoladas do solo. A espécie tipo é *C. necator*, bactéria predadora não obrigatória (MAKKAR; CASIDA JUNIOR, 1987).

Estirpes desse gênero têm sido descritas como nodulíferas de leguminosas, a primeira espécie nodulífera encontrada no gênero foi *C. taiwanenses*, isolada de espécies de *Mimosa*, essa espécie foi descrita, primeiramente, como *Ralstonia taiwanenses* e depois movida para o gênero *Cupriavidus*. Outros relatos de simbiose de estirpes de *Cupriavidos* em simbiose com leguminosas têm sido feitos (BARRETT; PARKER, 2006; CHEN et al., 2001; FLORENTINO et al., 2009; SILVA et al., 2012).

Ochrobactrum

O gênero *Ochrobactrum* foi proposto para englobar bactérias cujas células apresentam como principais características: forma de bastões, geralmente, ocorrem isoladamente, são gram negativas, móveis por meio de flagelos peritricosos, obrigatoriamente, aeróbios. A temperatura ótima de

crescimento está na faixa de 20 até 37 °C. Colônias em ágar nutriente não são pigmentadas. As células têm oxidase e catalase positivas. São quimio-organotróficas, usando uma variedade de aminoácidos, ácidos orgânicos e hidratos de carbono como fonte de carbono. Ocorrem em espécimes clínicos humanos. O teor de G + C do DNA é 56 a 59% molar. Parâmetros de hibridização de DNA-RNA indicam que *Ochrobactrum* pertence ao ramo *Brucella*, superfamília IV. No nível supragenérico, *Ochrobactrum* está relacionada com *Brucella*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* e *Agrobacterium*. A espécie tipo é *Ochrobactrum anthropi* (HOLMES et al., 1988). Após a proposição do gênero estirpes isoladas de diversas leguminosas, entre elas arbóreas, como *Acacia mangium*, começaram a serem identificadas, no gênero *Ochrobactrum* e algumas espécies foram propostas, dentro de rizóbios, como é o caso de *Ochrobactrum lupini*, isolada de *Lupinus albus* e *Ochrobactrum cytisi*, isolada de *Cytisus scoparius* (NGOM et al., 2004; TRUJILLO et al., 2005; ZURDO-PIÑEIRO et al., 2007).

2.3 A família *Leguminosae* (*Fabaceae*)

A família *Leguminosae*, também, denominada *Fabaceae*, é composta por cerca de 720 gêneros e 18000 a 20000 espécies e, no Brasil, ocorrem, aproximadamente, 215 gêneros e 2750 espécies (DOYLE; LUCKOW, 2003; LEWIS et al., 2005; LIMA et al., 2014). *Leguminosae* é a terceira maior família entre as Angiospermas sendo superada apenas pelas famílias *Asteraceae* e *Orchidaceae* (DOYLE; LUCKOW, 2003). Essa família é dividida em três subfamílias: *Papilionoideae* (*Faboideae*), *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* e possui uma distribuição cosmopolita com espécies herbáceas, arbustivas, arbóreas e lianas (RODRIGUES; MACHADO, 2006). A subfamília *Caesalpinioideae* é considerada a mais primitiva e a primeira a evoluir, apesar de algumas evidências recentes colocarem esta hipótese em dúvida

(HERENDEEN; CREPET; DILCHER, 1992; SPRENT; PARSONS, 2000). A subfamília *Mimosoideae* consiste, principalmente, de árvores com ocorrência, predominantemente, tropical e subtropical. *Papilionoideae* é a maior subfamília, é mais conhecida por suas espécies cultivadas, mas inclui muitas espécies de árvores e, nessa família, ocorre nodulação na maioria dos gêneros (SPRENT; PARSONS, 2000). Cerca de 7200 leguminosas são arbóreas, mas apenas 23% delas foram investigadas quanto à capacidade de nodulação e a maioria das espécies nodulíferas pertencem à *Papilionoideae* e *Mimosoideae* (DART; GUTTERIDGE; SHELTON, 1994; RODRIGUES; MACHADO, 2006; SPRENT, 1995).

O grupo das leguminosas é extremamente diversificado e se tornou onipresente, nos biomas terrestres modernos. A presença dessa família vai desde florestas tropicais até desertos e de baixadas até habitats alpinos, além da existência de espécies aquáticas (DOYLE; LUCKOW, 2003; LAVIN; HERENDEEN; WOJCIECHOWSKI, 2005). As leguminosas estão bem representadas na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros (SOUZA; LORENZI, 2005). *Leguminosae* apresenta grande importância econômica e agrícola e inclui espécies utilizadas para alimentação, extração de óleos e compostos químicos, fibra, combustível, madeira, uso medicinal e enriquecimento do solo (WOJCIECHOWSKI, 2003).

2.4 Importância do uso de leguminosas arbóreas no trópico úmido

Importância e características levadas em consideração na escolha de leguminosas arbóreas a serem utilizadas no trópico úmido serão abordadas neste tópico. Além disso, serão mencionadas características peculiares das leguminosas arbóreas leucena, acácia, sombreiro e gliricídia.

2.4.1 Leguminosas arbóreas: utilização na região tropical úmida (periferia da Amazônia)

No trópico úmido, são observadas elevadas temperaturas, precipitações e irradiação solar, o que resulta em rápida decomposição da matéria orgânica e dificuldade para manutenção da cobertura do solo, essencial para evitar a erosão e lixiviação de nutrientes. Esses fatores, combinados com os solos derivados de rochas sedimentares, predominantes nessa região, resultam em solos frágeis e carentes de nutrientes, tudo isso se traduz em condições desfavoráveis para a obtenção de agrossistemas sustentáveis (AGUIAR et al., 2010). O manejo sustentável dos solos do trópico úmidos, que inclui a periferia amazônica, é o maior desafio para pequenos agricultores da região e consiste numa situação preocupante visto o uso insustentável do solo da área desmatada na fronteira amazônica constituir uma das maiores ameaças para a floresta (MOURA et al., 2013).

Em virtude do exposto, pode-se afirmar que, no trópico úmido, mais especificamente na periferia da região amazônica, as leguminosas arbóreas detêm maior importância por apresentarem habilidade de colonizar e aportar nitrogênio em ambientes com solos pobres e, em virtude de sua produção de biomassa, continua durante todo o ano, inclusive, em longos períodos de estiagem, o que proporciona possibilidade de cobertura do solo (BALA; GILLER, 2006). Essas leguminosas podem ser utilizadas, para recuperação de áreas degradadas, em sistemas agrossilvipastoris e agroflorestais, na produção de forragem de alta qualidade para a alimentação de gado, na estabilização de taludes contra a erosão, na cobertura em longo prazo, em ambientes adversos, para evitar a degradação, na utilização como cobertura rica em nitrogênio para agrossistemas, produção de madeira e lenha, cercas vivas, árvores de sombra para as culturas de plantio, como treliças para escalada culturas, produção de frutas e legumes para consumo humano e até como matéria prima para produção

de biocombustíveis (BISWAS; SCOTT; GRESSHOFF, 2011; GUTTERIDGE; SHELTON, 1993).

2.4.2 Escolha de leguminosas arbóreas para sistemas agroflorestais ou recuperação de áreas degradadas no trópico úmido

Atualmente, leguminosas arbóreas de interesse econômico e ambiental se encontram distribuídas pelo mundo e algumas espécies, mesmo tendo seus centros de origem em outras regiões, encontram-se agora largamente distribuídas nos trópicos (BALA et al., 2003). O sucesso da FBN das leguminosas, tanto introduzidas quanto nativas, depende da presença de rizóbios compatíveis e eficientes na comunidade nativa do solo, leguminosas introduzidas podem estabelecer simbiose com rizóbios indígenas ou inoculados (BALA et al., 2003; GILLER et al., 1994; PÉREZ-RAMIREZ et al., 1998). Logo, a avaliação da presença ou não de estirpes eficientes na comunidade nativa da área e previsão da necessidade de inoculação é o primeiro passo para o estabelecimento de leguminosas arbóreas independente da finalidade para a qual elas se destinam.

A recuperação de áreas degradadas tropicais é um processo lento, trabalhoso e incerto devido a fatores como: agressividade e dominância de gramíneas, baixa fertilidade dos solos, queimadas, condições climáticas desfavoráveis e falta de bancos de sementes de leguminosas arbóreas nativas. Estes entraves dificultam o restabelecimento inicial das espécies vegetais, entretanto, essa condição pode ser contornada com a implantação e o restabelecimento de leguminosas arbóreas com objetivo de favorecer e acelerar o processo de sucessão vegetal (BROWN; LUGO, 1994; PORROTA; TURNBULL; JONES, 1997; SILVA JÚNIOR; SACRANO; SOUZA, 1995).

A introdução de leguminosas arbóreas, em agrossistemas, resulta em diversos benefícios para a cultura associada como: aporte de matéria orgânica, tamponamento das temperaturas do solo; proteção contra erosão eólica; controle

da erosão superficial; aumento da diversidade de espécies e produção de metabólitos secundários que podem exercer efeitos alelopáticos, inibindo a germinação de sementes e/ou afetando o crescimento de plântulas indesejadas (FERRAZ JÚNIOR, 2004; MOURA, 1995).

A escolha de espécies arbóreas, para uso em sistemas agroflorestais ou agrossilvipastoris, deve levar em consideração as seguintes características: fácil estabelecimento no campo, sistema radicular profundo, crescimento rápido, tolerância ao corte, alta capacidade de rebrota, elevada produção de biomassa, fixação biológica de N, altos teores de N e P na biomassa, biomassa de fácil decomposição, capacidade de competição com a pastagem, no caso de sistemas agrossilvipastoris, e tolerância a condições adversas de solo, principalmente, baixa fertilidade e acidez (AKINNIFESI; KANG; LADIPO, 1999; BEER, 1997; DANSO; BOWEN; SANGINGA, 1992; DIAS; SOUTO; FRANCO, 2008; FERRAZ JÚNIOR, 2004; KANG; REYNOLDS; ATTA-KRAH, 1990; SZOTT; PALM; SANCHEZ, 1991). Entre as leguminosas, que apresentam essas características, serão aqui destacadas a leucena (*Leucaena leucocephala*), acácia (*Acacia mangium*), sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) e gliricídia (*Gliricidia sepium*).

2.4.3 Leucena: características, uso e fixação biológica de nitrogênio

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) é uma leguminosa arbórea de crescimento rápido pertencente à subfamília *Mimosoideae* que apresenta elevada fixação biológica de nitrogênio (média de 177 a 247 kg.ha⁻¹), alto teor de N nas folhas (em torno de 1,3%) e alta produção de biomassa (cerca de 5 t.ha⁻¹) (NASCIMENTO; SILVA, 2004; SZOTT; PALM; SANCHEZ, 1991; TIAN; KANG; BRUSSAARD, 1992). Nativa da América Central, essa espécie, atualmente, encontra-se amplamente distribuída, principalmente, nas regiões tropicais, sendo utilizada para recuperação da cobertura vegetal, reabilitação de

áreas degradadas, sistemas agroflorestais ou agrossilvipastoris, forragem, alimentação humana, lenha, madeira, adubo verde, sombra, apoio para espécies escandentes, quebra-ventos e controle de erosão (COSTA; DURIGAN, 2010; SHELTON; BREWBAKER, 1994).

Entre as condições requeridas para o cultivo de leucina, destacam-se temperatura ideal de crescimento entre 25°C e 30°C, com baixa resistência a geadas e baixas temperaturas; bom desempenho numa ampla gama de ambientes de precipitação, entre 650 a 3000 mm; alto requerimento de luminosidade; suscetível à deficiência de fósforo e cálcio; intolerância à elevada acidez e solos alagados; melhor desempenho em solos profundos, bem drenados, argilosos, neutros ou calcários e com bons níveis de cálcio e fósforo, apesar de ser capaz de crescer em uma grande variedade de tipos de solo, incluindo solos ligeiramente ácidos (BRAY, 1994; SHELTON; BREWBAKER, 1994).

Ao se analisar a capacidade simbiótica de leucena com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), também, denominados rizóbios, pode-se verificar que a espécie é promiscua. Leucena é capaz de nodular com os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* e *Cupriavidus*. Pesquisas realizadas até o momento indicam que a nodulação desta espécie ocorre, preferencialmente, com rizóbios de crescimento rápido (BALA; GILLER, 2001; BALA; MURPHY; GILLER, 2003; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; SANGINGA; VANLAUWE; DANSO, 1995; SILVA et al., 2012; WANG et al., 2006; WANG; MARTÍNEZ-ROMERO; MARTINEZ-ROMERO, 1999). Essas informações são confirmadas pelo levantamento realizado neste estudo (QUADRO 1). A maioria dos estudos identifica estirpes nos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* e apenas um relatou a ocorrência de simbiose entre leucena e *Bradyrhizobium*, o que corrobora a preferência de nodulação de leucena com estirpes de crescimento rápido. Entretanto, deve-se

levar em consideração o fato da proposição de muitos gêneros de rizóbios ter sido feita recentemente, portanto algumas estirpes identificadas, em trabalhos mais antigos, podem pertencer a outros gêneros, ainda, não descritos na época. Essa observação estende-se aos demais levantamentos encontrados a seguir.

Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões. (Continua)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em leucena	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Zhang et al. (1991)	Hawaii, Nova Guiné, Tailândia e EUA,	Nódulos coletados em campo	Caracterização fenotípica, capacidade de crescimento em pH ácido e alcalino, capacidade de hidrólise de ureia, solubilização de fosfato, capacidade de crescimento na presença de KNO ₃ , redução de nitrato, produção de melanina, tolerância à NaCl, resistência intrínseca a metal pesado e antibióticos, utilização de aminoácidos como única fonte de nitrogênio, utilização de fontes de carbono, cross-nodulatio	<i>Rhizobium</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Medicago sativa</i> e <i>Galega orientalis</i>
Moawad e Bohlool (1992)	Hawaii, Filipinas e Indonésia	Não mencionado	Morfologia de colônia, IAR e técnicas serológicas, microscopia de imunofluorescência	<i>Rhizobium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
Turk e Keyser (1992)	Estirpes da coleção do NifTAL	Não mencionado (estirpes da coleção NifTAL)	Caracterização fenotípica em meio YMA com azul de bromotimol, crescimento em meio mínimo com lactose e sacarose e presença da enzima β-galactosidase	<i>Rhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i> , <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Caliandra calothyrsus</i> . <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Acacia auriculiformes</i> , <i>A. mangium</i> , <i>A. mearnsii</i> , <i>Paraserianthes falcataria</i> , <i>Thephrosia candida</i>

Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em leucena	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Moreira et al. (1993)	Amazônia e sudeste do Brasil	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação e de nódulos coletados em campo	SDS- PAGE	<i>Rhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
De Lajudie et al. (1994)	África	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação e de nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Testes morfológicos e fisiológicos, PAGE de proteínas bacterianas totais, Auxanographic tests, composição de bases de DNA e hibridização DNA-DNA	<i>Rhizobium</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>A. albida</i> , <i>A. seyal</i> , <i>A. raddiana</i> , <i>Sesbani a rostrata</i> , <i>S. pubescens</i> , <i>S. grandiflora</i> , <i>Neptunia oleracea</i> , e <i>L. leucocephala</i>
Kuykendall et al. (1996)	Egito	Nódulos coletados em campo	RFLP	<i>Rhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i>
Swelim et al. (1997)	Egito	Nódulos coletados em campo	Caracterização fenotípica, resistência à salinidade, pH e temperatura, utilização de fontes de carbono	<i>Rhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i>
De Lajudie et al. (1998b)	Regiões da África, Américas, Ásia, Austrália e Europa	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Descrição morfológica por microscopia, PAGE de proteínas bacterianas totais, REP-PCR, composição de bases de DNA, Hibridização de DNA, teste de infecção do hospedeiro	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>A. seyal</i> , <i>A. tortilis</i> , <i>Sesbania rostrata</i> , <i>S. pubescens</i> , <i>S. grandiflora</i> , <i>Neptunia oleracea</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>A. nilotica</i> , <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Ononis repens</i>

Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em leucena	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Moreira, Haukka e Young (1998)	Florestas tropicais brasileiras	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Rhizobium</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Sinorhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
Wang, Martínez- Romero e Martínez- Romero (1999)	México	Estirpes isoladas de mudas cultivadas em campo aberto	PCR-RFLP do gene 16S rRNA, análise de multilocus enzyme eletrophoresis (MLEE), estimativa eletroforética do conteúdo de plasmídeo celular, hibridação de plasmídeos com 16S rDNA e genes simbióticos, RFLP de locos de genes simbióticos	<i>Mesorhizobium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i>
Bala e Giller (2001)	Regiões tropicais da África, Ásia e Américas	Não mencionado	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Rhizobium</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i> <i>Agrobacterium</i>	<i>L. leucocephala</i> + 27 espécies de leguminosas
Bala, Murphy e Giller (2003b)	Regiões da África, Ásia e Américas	Nódulos coletados de plantas iscas cultivadas sob condições controladas	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Análise de PCR-RFLP do gene 16S rRNA e região ITS entre 16S e 23S rRNA	<i>Rhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> <i>Allorhizobium</i>	Estirpes não autenticadas

Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em leucena	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Wang et al. (2003)	México	Estirpes isoladas de mudas cultivadas em campo aberto	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Análise de multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), hibridização DNA-DNA, determinação da composição de bases do DNA, caracterização fenotípica, taxonomia numérica, conteúdo plasmídeo celulares e identificação de plasmídeos simbióticos	<i>Mesorhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i> , <i>S. herbácea</i> , feijão
Bala e Giller (2006)	Solos tropicais da África, Ásia e Américas do Sul e Central	Nódulos coletados de plantas iscas cultivadas sob condições controladas	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR/RFLP do gene 16S rRNA e ITS da região entre 16S e 23S rRNA	<i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>C. calothyrsus</i> , <i>G. sepium</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>S. sesban</i>
Wang et al. (2006)	China	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR-RFLP, SDS-PAGE das proteínas celulares, caracterização fenotípica e Rep-PCR	<i>Agrobacterium</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>Acacia mangium</i> , <i>A. confuse</i> , <i>A. holose</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>Albizia falcata</i> , <i>A. julibrissin</i> e <i>A. kalkora</i>
Florentino et al. (2009)	Minas Gerais-Brasil	Nódulos coletados de plantas iscas cultivadas sob condições controladas	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Caracterização fenotípica, análise de proteínas totais	<i>Cupriavidus</i>	<i>S. virgata</i>

Quadro 1 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Leucaena leucocephala* em diversas regiões. (Conclusão)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em leucena	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Xu et al. (2013)	China	Nódulos coletados em campo, em trabalho anterior	Sequenciamento do gene 16S rRNA , PCR-RFLP do gene 16S rRNA, sequenciamento dos genes 16S rRNA, recA, nifH, and nodC, eficiência simbiótica	<i>Rhizobium</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Ensifer</i> <i>Bradyrhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i>

2.4.4 Acácia: características, uso e fixação biológica de nitrogênio

Acacia mangium Willd, popularmente conhecida como acácia, pertence à subfamília *Mimosoideae* e ao gênero *Acacia*, que engloba cerca de 1300 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Nativa da Austrália, Papua Nova Guiné e leste da Indonésia, é uma leguminosa arbórea pioneira, de porte elevado e considerada uma espécie muito plástica com bom crescimento tanto em locais úmidos quanto secos, mas preferencialmente úmidos, com precipitações ótimas médias anuais que variam de 1.000 até 4.500 mm e temperaturas entre 12°C e 34°C (LEMMENS; SOERIANEGARA; WONG, 1995; ROSSI; AZEVEDO; SOUZA, 2003). A acácia cresce bem em solos compactados, erodidos, degradados e em declividades acentuadas, além de tolerar solos com baixo pH e presença de altos teores de óxidos de ferro e alumínio e devido a essas características é indicada para projetos de recuperação de áreas degradadas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1983; ROSSI; AZEVEDO; SOUZA, 2003).

A acácia é leguminosa multifuncional que pode ser usada, além da recuperação de áreas degradadas, em funções como produção de madeira, papel, carvão e lenha, na fabricação de móveis, em construções em geral e de utensílios para agricultura, na produção de energia, em sistemas agroflorestais, como forrageira, na produção de adesivos e como planta ornamental (GALIANA; TIBOK; DUHOUX, 1991; LEMMENS; SOERIANEGARA; WONG, 1995; NRC, 1983; ROSSI; AZEVEDO; SOUZA, 2003).

Entre as características da acácia a capacidade de fixação biológica de nitrogênio em simbiose com rizóbios é certamente uma das mais vantajosas. Acácia é capaz de estabelecer simbiose com os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Ochrobactrum* (MOREIRA et al., 1993; NUSWANTARA et al., 1997; WANG et al., 2006). Entretanto, a simbiose entre acácia e estirpes de *Bradyrhizobium* é mais comum que com outros gêneros de rizóbios, como é demonstrado pelo levantamento de trabalhos envolvendo identificação de estirpes de rizóbios em simbiose com acácia (QUADRO 2). Alguns autores relatam que a nodulação efetiva de acácia ocorre apenas com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp., como *B. elkanii*, apesar de mudas de acácia mostrarem grande variabilidade em sua capacidade para fixar N₂ em simbiose com suas estirpes específicas de *Bradyrhizobium* (GALIANA et al., 1990; GALIANA; TIBOK; DUHOUX, 1991; LE ROUX et al., 2009; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; PERRINEAU et al., 2011; TURK; KEYSER, 1992).

Quadro 2 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Acacia mangium* em diversas regiões. (Continua)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em acácia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Zhang et al. (1991)	Tailândia	Nódulos coletados em campo	Caracterização fenotípica, capacidade de crescimento em pH ácido e alcalino, capacidade de hidrólise de ureia, solubilização de fosfato, capacidade de crescimento na presença de KNO ₃ , redução de nitrato, produção de melanina, tolerância a NaCl, resistência intrínseca a metal pesado e antibióticos, utilização de aminoácidos como única fonte de nitrogênio, utilização de fontes de carbono, cross-nodulatio	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i> , <i>Leucaena Leucocephala</i> , <i>Macropitilium atropurpureum</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Medicago sativa</i> e <i>Galega orientalis</i>
Turk e Keyser (1992)	Coleção do projeto NifTAL (Ásia)	Não mencionado	Caracterização fenotípica em meio YMA com azul de bromotimol, crescimento em meio mínimo com lactose e sacarose e presença da enzima β-galactosidase	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i> , <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Caliandra calothyrsus</i> . <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Acacia auriculiformes</i> , <i>A. mangium</i> , <i>A. mearnsii</i> , <i>Paraserianthes falcataria</i> , <i>Thephrosia candida</i>

Quadro 2 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Acacia mangium* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em acácia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Moreira et al. (1993)	Amazônia e sudeste do Brasil	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	SDS- PAGE	<i>Bradyrhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
Galiana et al. (1994)	África	Não mencionado	Análises sorológicas e relacionamento sorológico entre estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> e tipagem sorológica de bacterióides	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A. mangium</i>
Nuswantara et al. (1997)	Indonésia	Não mencionado	Sequenciamento do gene 16S rRNA, RFLP-16s rDNA, REP-PCR	<i>Bradyrhizobium</i>	Não há informações sobre autenticação
Galiana et al. (1998)	África	Nódulos coletados em campo	Tipagem serológica (método de imunofluorescência indireta descrito por Somasegaran e Hoben (1985))	<i>Bradyrhizobium Rhizobium</i>	<i>A. mangium</i>
Moreira, Haukka e Young (1998)	Florestas tropicais brasileiras	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Bradyrhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas

Quadro 2 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Acacia mangium* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em acácia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Frémont et al. (1999)	Malásia	Não mencionado	PCR do operon rRNA seguido por análise RFLP dos produtos de PCR compreendendo o espaço ITS entre 16S e 16S:23S, testes de nodulação, teste de resistência a antibióticos, caracterização cultural	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia auriculiformis</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>A. ampliceps</i> , <i>A. aneura</i> , <i>A. aulacarpa</i> , <i>A. cincinnata</i> , <i>A. crassicarpa</i> , <i>A. farnesiana</i> , <i>A. holosericea</i> , <i>A. trachycarpa</i> , <i>A. tumida</i> , <i>Albizia lebbeck</i> , <i>Faidherbia albida</i> , <i>Gliricidia sepium</i> e <i>Paraserianthes falcataria</i> .
Clapp et al. (2001)	Indonésia	Não mencionado	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR-RFLP do gene 16 s rRNA, PRS análises	<i>Bradyrhizobium</i> e <i>Mesorhizobium</i>	Estirpes não autenticadas
Ngom et al. (2004)	Filipinas e Tailândia	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, caracterização fisiológica, ensaio de nodulação, análise quimiotaxonômica e conteúdo de G+C, RAPD, observações microscópicas dos nódulos por microscópio de luz e microscópios eletrônicos de transmissão e varredura	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Ochlobactrum</i>	<i>A. mangium</i> , <i>A. albida</i> , <i>A. melifera</i> , <i>A. tortilis</i> , <i>Paraserianthes falcataria</i> , <i>Leucaena glauca</i> e <i>Parkinsonia aculeata</i> .
Wang et al. (2006)	China	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR-RFLP, SDS-PAGE das proteínas celulares, caracterização fenotípica e Rep-PCR	<i>Agrobacterium</i> <i>Mesorhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia mangium</i> , <i>A. confuse</i> , <i>A. holose</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>Albizia falcataria</i> , <i>A. julibrissin</i> e <i>A. kalkora</i>

Quadro 2 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Acacia mangium* em diversas regiões. (Conclusão)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em acácia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Le Roux et al. (2009)	Malásia e Austrália	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, caracterização fenotípica, sequenciamento da região ITS entre 16S e 23S rRNA e análise filogenética	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A. mangium</i> , <i>A. auriculiformis</i> e híbridos <i>A. mangium</i> x <i>A. auriculiformis</i>
Perrineau et al. (2011)	Brasil	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento dos genes housekeeping (<i>dnaK</i> , <i>glnII</i> , <i>recA</i>) e do gene <i>nodA</i> ,	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A. mangium</i>
Perrineau et al. (2014)	Malásia e Senegal	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento de 3 genes housekeeping genes (<i>recA</i> , <i>dnaK</i> e <i>glnII</i>) e 2 genes simbióticos (<i>nodA</i> e <i>nifH</i>)	<i>Mesorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>	<i>A. mangium</i>

2.4.5 Gliricídia: características, uso e fixação biológica de nitrogênio

A gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp.) é uma leguminosa arbórea de porte médio que pode atingir até 12 m de altura, pertence à família *Leguminosae*, à subfamília *Papilionoideae* e a tribo *Robinieae* (BRAY, 1994). Nativa da Mesoamérica, é considerada a segunda mais importante leguminosa arbórea multifuncional, superada apenas pela *Leucaena leucocephala* (BATISH et al., 2007). Capaz de produzir cerca de 5 t ha⁻¹ de matéria seca e 186 kg ha⁻¹ de nitrogênio, é utilizada para sombreamento de culturas, suporte para culturas escandentes, para produção de lenha, cercas vivas, na construção, como planta ornamental, para forragem animal, como adubo verde, para a estabilização do solo, em sistemas agroflorestais, na medicina tradicional, para o eczema e apresenta possibilidade de uso para a recuperação de áreas degradadas (SIMONS; STEWART; TIAN; KANG; BRUSSAARD, 1992).

A gliricídia não é muito exigente quanto à temperatura, apesar de não tolerar geadas, apresenta boa tolerância a queimadas com rebrota rápida com a chegada das chuvas, é capaz de crescer uma grande diversidade de tipos de solo desde altamente erodidos até solos arenosos, argilosos e calcários, de reação de ácida à alcalina (pH 4.5-6.2) (HUGHES, 1987; SIMONS; STEWART, 1994). Em decorrência de sua alta capacidade de adaptação climática, tem sido transportada para a maioria dos países tropicais e é, agora, amplamente distribuída nessa região.

A capacidade de fixação biológica de nitrogênio constitui uma vantagem, para a utilização dessa espécie, especialmente, para fins de adubação verde e para uso em sistemas agroflorestais. Gliricídia tende a estabelecer simbiose, preferencialmente rizóbios de crescimento rápido, principalmente, do gênero *Rhizobium* (ACOSTA-DURÁN; MARTINEZ-ROMERO, 2002; FLORENTINO et al., 2014). Fato confirmado pela grande presença do gênero *Rhizobium*, em levantamento realizado com os principais trabalhos, envolvendo *Gliricidia sepium* em simbiose com rizóbios, identificados por uma grande variedade de metodologias moleculares ou clássicas (QUADRO 3).

Quadro 3 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Gliricidia sepium* em diversas regiões. (Continua)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em gliricídia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Turk e Keyser (1992)	Coleção NifTAL (Ásia)	Não mencionado (estirpes da coleção NifTAL)	Caracterização fenotípica em meio YMA com azul de bromotimol, crescimento em meio mínimo com lactose e sacarose e presença da enzima β -galactosidase	<i>Rhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i> , <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Caliandra calothyrsus</i> , <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Acacia auriculiformes</i> , <i>A. mangium</i> , <i>A. mearnsii</i> , <i>Paraserianthes falcataria</i> , <i>Thephrosia candida</i>
Moreira et al. (1993)	Amazônia e sudeste do Brasil	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	SDS- PAGE	<i>Rhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
Moreira, Haukka e Young (1998)	Florestas tropicais brasileiras	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Rhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitilium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
McInroy et al. (1999)	Regiões da África, Europa, Américas e Ásia	Não mencionado	Sequenciamento do gene 16S rRNA, Utilização de fontes de carbono	<i>Rhizobium</i>	Estirpes autenticadas em trabalhos anteriores nos hospedeiros de origem (<i>F. albida</i> , <i>Acacia arenaria</i> , <i>A. karoo</i> , <i>A. nilótica</i> , <i>A. Senegal</i> , <i>A. tortilis</i> , <i>G. sepium</i> , <i>S. sesban</i> e <i>P. chilensis</i>)

Quadro 3 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Gliricidia sepium* em diversas regiões. (Continuação)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em gliricídia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Melchor-Marroquin et al. (1999)	México	Nódulos coletados em campo	Sorológico e morfologia de colônias	<i>Rhizobium</i>	<i>G. sepium</i>
Bala e Giller (2001)	Regiões tropicais da África, Ásia e América	Não mencionado	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Rhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>L. leucocephala</i> + 27 espécies de leguminosas
Acosta-Durán e Martínez-Romero (2002)	México	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR-RFLP, izoenzimas por eletroforese em gel, padrões de plasmídios, hibridização de DNA	<i>Rhizobium</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>G. sepium</i> , <i>Acacia farnesiana</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>L. leucocephala</i>
Bala, Murphy e Giller (2003)	Regiões tropicais de três continentes	Nódulos coletados de plantas iscas cultivadas sob condições controladas	Sequenciamento do gene 16S rRNA, análise do PCR-RFLP da região ITS entre 16S e 23S	<i>Rhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> / <i>Allorhizobium</i>	Estirpes não autenticadas
Thiao et al. (2004)	Kenya, Reunion Island e New Caledonia	Nódulos coletados em campo	Testes bioquímicos e metabólicos (uso de amino ácidos, tolerância a NaCl metais pesados, ureia e fontes de carbono)	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	<i>G. sepium</i>
Zurdo-Piñeiro et al. (2004)	EUA	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, características fenotípicas, Perfil de RNAs de baixo peso Molecular (LMW), RAPD com dois primers, Análise de PCR-RFLP do gene 16S rRNA	<i>Rhizobium</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>

Quadro 3 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Gliricidia sepium* em diversas regiões. (Conclusão)

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em gliricídia	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Bala e Giller (2006)	África, Ásia e Américas do Sul e Central	Nódulos coletados de plantas iscas cultivadas sob condições controladas	Sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR/RFLP do gene 16S rRNA e ITS da região entre 16S e 23S rRNA	<i>Rhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Sinorhizobium</i>	<i>C. calothyrsus</i> , <i>G. sepium</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>S. sesban</i>
Degefu, Wolde-Meskel e Frostegård (2013)	Etiópia	Nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA, filogenia	<i>Rhizobium</i>	Estirpes não autenticadas
Florentino et al. (2014)	Brasil	Nódulos coletados em campo	Caracterização morfológica e tolerância a pH e salinidade	Predominância de rizóbios de crescimento rápido	<i>G. sepium</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Crotalaria spectabilis</i>

2.4.6 Sombreiro: características, uso e fixação biológica de nitrogênio

O sombreiro (*Clitoria fairchildiana* R.A.Howard), também, denominado de palheteira, faveira ou sombra de vaca, é uma leguminosa arbórea de médio a grande porte, rústica e de rápido crescimento. Essa espécie pertence à família *Leguminosae* e à subfamília *Papilionoideae*, é nativa do Brasil e tem domínio fitogeográfico na floresta amazônica. O sombreiro apresenta nítida preferência por solos férteis e úmidos, podendo, também, ocorrer em áreas abertas e alteradas (DUCKE, 1949; LORENZI, 1992). É empregado na construção civil, como cultura de sombreamento, como planta ornamental, pode ser utilizada em reflorestamentos e recuperação de áreas degradadas, como adubo verde e em sistemas agroflorestais (CARNEIRO et al., 1998; FORTES, 2000; LORENZI, 1992; PAULA; ALVES, 1997; PORTELA; SILVA; PIÑA-RODRIGUES, 2001; SILVA; MÔRO, 2008).

A capacidade de fixação biológica de nitrogênio do sombreiro é conhecida, mas pouco estudada, apesar de apresentar alta produção de biomassa (cerca de 8 t.ha⁻¹) e nitrogênio (328 kg.ha⁻¹) com relatos de simbiose com estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (LEITE et al., 2008; LEITE; FERRAZ JÚNIOR, 2002; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; SINCLAIR; EAGLESHAM, 1990; TIAN; KANG; BRUSSAARD, 1992).

Quadro 4 - Levantamento de trabalhos mais relevantes que identificam rizóbios, em nível de gênero, em simbiose com *Clitoria fairchildiana* em diversas regiões.

Autores	Local de estudo/ origem das estirpes	Fonte das estirpes (nódulos coletados ou planta isca)	Metodologias de identificação	Gêneros encontrados em sombreiro	Autenticação/ Leguminosas utilizadas
Sinclair e Eaglesham (1990)	África	Não mencionado	Morfologia da colônia e características sorológicas usando a técnica ELISA	<i>Bradyrhizobium</i>	Estirpes não autenticadas
Moreira et al. (1993)	Estirpes oriundas da Amazônia e floresta Atlântica	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	SDS-PAGE	<i>Rhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas
Moreira, Haukka e Young (1998)	Florestas tropicais brasileiras	Estirpes isoladas de plantas iscas em casa de vegetação ou de nódulos coletados em campo	Sequenciamento do gene 16S rRNA	<i>Bradyrhizobium</i>	Estirpes autenticadas em outros trabalhos usando <i>Macropitium atropurpureum</i> (siratro) e espécies de origem das estirpes ou espécies relacionadas

3 CONCLUSÃO

As leguminosas arbóreas leucena, acácia, sombreiro e gliricídia apresentam características desejáveis, para uso em sistemas agroflorestais e em recuperação de áreas degradadas, além de serem capazes de estabelecer simbiose e fixar nitrogênio com estirpes bacterianas de diversos gêneros. A investigação da eficiência de fixação de nitrogênio de estirpes nativas ou introduzidas é essencial para a otimização do uso dessas leguminosas.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 178, n. 2, p. 161-164, 2002.

AGUIAR, A. D. C. F. et al. Efficiency of an agrosystem designed for family farming in the pre-Amazon region. **Renewable Agriculture and Food Systems**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 24-30, 2010.

AKINNIFESI, F. K.; KANG, B. T.; LADIPO, D. O. Structural root form and fine root distribution of some woody species evaluated for agroforestry systems. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 42, p. 121-138, 1999.

AMIJEE, F.; GILLER, K. E. Environmental constraints to nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in Tanzania, I: a survey of soil fertility, root nodulation and Multilocational responses to rhizobium inoculation. **African Crop Science**, Dhaka, v. 6, p. 159-169, 1998.

AYNABEBA, A. et al. Studies of *Rhizobium* inoculation and fertilizer treatment on growth and production of faba bean (*Vicia faba*) in some yield depleted and yield sustained regions of Semien Showa. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, Addis Ababa, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2001.

AZEVEDO, H. et al. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. **BMC Genomics**, London, v. 16, n. 5, p. S1-10, 2015. Supplement.

BALA, A. et al. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003a.

BALA, A.; GILLER, K. E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 76, n. 2/3, p. 319-330, 2006.

BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 149, n. 3, p. 495-507, 2001.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 917-929, 2003b.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 1198-1206, July 2006.

BATISH, D. R. et al. (Ed.). **Ecological basis of agroforestry**. Boca Raton: CRC, 2007. 400 p.

BEER, J. Café bajo sombra en América Central: hace falta más investigación sobre este sistema agroforestal exitoso? **Agroforestería en Iás Américas**, San José, v. 4, n. 13, p. 4-5, 1997.

BENHIZIA, Y. et al. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 4, p. 462-468, 2004.

BERKUM, P. van; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.

BISWAS, B.; SCOTT, P. T.; GRESSHOFF, P. M. Tree legumes as feedstock for sustainable biofuel production: opportunities and challenges. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 16, p. 1877-1884, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microorganismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, n. 58, 25 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>>. Acesso em: 28 abr. 2016.

BRAY, R. A. Diversity within tropical tree and shrub legumes. In: MATHISON, G. W. (Ed.). **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 101-106.

BROWN, S.; LUGO, A. E. Rehabilitation of tropical lands: a key sustaining development. **Restoration Ecology**, Malden, v. 2, p. 97-111, 1994.

BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 30, p. 225-420, 1980.

CADISCH, G. et al. N recovery from legumeprunings and priming effects are governed by the residue quality. **Plant and Soil**, The Hague, v. 205, p. 125-134, 1998.

CAMPBELL, C. A.; MYERS, R. J. K.; CURTIN, D. Managing nitrogen for sustainable crop production. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, n. 1/3, p. 277-296, 1995.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas de ocorrência no sudeste do Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.

CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

CASIDA JUNIOR, L. E. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 32, n. 3, p. 339-345, 1982.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

CHRISTENSEN, B. T. **Organic matter in soil-structure, function and turnover**. 2000. 95 p. Thesis (Ph.D. in Soil Biology) - Danish Institute of Agricultural Sciences, Foulum, 2000.

CLAPP, J. P. et al. Ribotyping of rhizobia nodulating *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* from different geographical areas in Indonesia using PCR-RFLP-SSCP (PRS) and sequencing. **Environmental Microbiology**, Wageningen, v. 3, n. 4, p. 273-280, 2001.

COELHO, K. P. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de gliricídia, leucena e sombreiro no Maranhão.** 2010. 67 f.

Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.

COSTA, J. N. M. N. da; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): invasive or ruderal? **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 825-833, 2010.

DANSO, S. K. A.; BOWEN, G. D.; SANGINGA, N. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. **Plant and Soil**, The Hague, v. 141, p. 177-196, 1992.

DART, P. J.; GUTTERIDGE, R. C.; SHELTON, H. M. Microbial symbioses of tree and shrub legumes. In: MATHISON, G. W. (Ed.). **Forage tree legumes in tropical agriculture.** Wallingford: CAB International, 1994. p. 143-157.

DE LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal.

International Journal of Systematic Bacteriology, Reading, v. 48, n. 4, p. 1277-1290, 1998a.

DE LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 2, p. 369-382, 1998b.

DE LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.

International Journal of Systematic Bacteriology, Reading, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; FROSTEGÅRD, Å. Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 36, n. 4, p. 272-280, 2013.

DELAMUTA, J. R. et al. 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 para sistemas silvipastoris**. Nitéroí: Pesagro, 2008. 9 p. (Programa Rio Rural. Manual Técnico, 9).

DIEKMANN, K. H.; DE DATTA, S. K.; OTTOW, J. C. G. Nitrogen uptake and recovery from urea and green manure in lowland rice measured by ¹⁵N and non-isotope techniques. **Plant and Soil**, The Hague, v. 148, p. 91-99, 1993.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, n. 3, p. 900-910, 2003.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988.

DUCKE, A. **Notas sobre a flora neotrópica**: as leguminosas da Amazônia Brasileira. Manaus: Instituto Agrônômico do Norte, 1949. 248 p. (Instituto Agrônômico do Norte. Boletim Técnico, 18).

FERRAZ JUNIOR, A. S. L. **Arroz de sequeiro em sistema de cultivo em aléias sobre solo de baixa fertilidade natural**. 2000. 186 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

FERRAZ JUNIOR, A. S. L. O cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do trópico úmido. In: MOURA, E. G. (Org.). **Agroambientes de transição**: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão, 2004. p. 71-100.

FISHER, K.; NEWTON, W. Nitrogen fixation: a general overview. **Nitrogen fixation at the millennium**. Amsterdam: Elsevier, 2002. 34 p.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 37, n. 3, p. 320-338, 2014.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009.

FORTES, J. L. O. **Reabilitação de depósito de rejeito de refino de bauxita com uso de resíduos industriais e leguminosas arbóreas**. 2000. 184 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRÉMONT, M. et al. A comparison of Bradyrhizobium strains using molecular, cultural and field studies. **Plant Science**, Shannon, v. 141, n. 1, p. 81-91, 1999.

GALIANA, A. et al. Improvement of nitrogen fixation in *Acacia mangium* through inoculation with rhizobium. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 40, n. 3, p. 297-307, 1998.

GALIANA, A. et al. Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing selected *Bradyrhizobium* strains under field conditions: long-term effect on plant growth and persistence of the introduced strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 11, p. 3974-3980, 1994.

GALIANA, A. et al. Nitrogen-fixing potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, p. 261-267, 1990.

GALIANA, A.; TIBOK, A.; DUHOUX, E. In vitro propagation of the nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd. **Plant and Soil**, The Hague, v. 135, n. 2, p. 151-159, 1991.

GILLER, K. E. et al. The origin and diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in African soils. In: SPRENT, J. I.; MCKEY, D. (Ed.). **Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994. p. 57-62.

GUALTER, R. M. R. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 303-308, mar. 2011.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, July 2012.

GUIMARÃES, A. A. et al. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015.

GUTTERIDGE, R. C.; SHELTON, H. M. The scope and potential of tree legumes in agroforestry. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 23, n. 2/3, p. 177-194, 1993.

HERENDEEN, P. S.; CREPET, W. L.; DILCHER, D. L. The fossil history of the Leguminosae: phylogenetic and biogeographical implications. In: HERENDEEN, P. S.; DILCHER, D. L. (Ed.). **Advances in legume systematics, part 4: the fossil record**. London: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 303-316.

HOLMES, B. et al. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 4, p. 406-416, 1988.

HUGHES, C. E. **Biological considerations in designing a seed collection humid tropics**. Washington: National Academy, 1983.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; DELAMUTA, J. R. M. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: DE BRUIJN, F. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. Hoboken: J. Wiley, 2015. p. 191-202.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.

JARVIS, B. D. W.; PANKHURST, C. E.; PATEL, J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 32, p. 378-380, 1982.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 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**, Reading, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.
- KANG, B. T.; REYNOLDS, L.; ATTA-KRAH, A. N. Alley farming. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 43, p. 315-359, 1990.
- KUYKENDALL, L. D. et al. Symbiotic competence, genetic diversity and plasmid profiles of Egyptian isolates of a *Rhizobium* species from *Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 347-352, 1996.
- LAMBAIS, M. R. et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: _____. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.
- LANG, E. et al. *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 4, p. 1505-1511, 2013.
- LAVIN, M.; HERENDEEN, P. S.; WOJCIECHOWSKI, M. F. Evolutionary rates analysis of *Leguminosae* implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. **Systematic Biology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 575-594, 2005.
- LE ROUX, C. et al. *Bradyrhizobia* nodulating the *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* interspecific hybrid are specific and differ from those associated with both parental species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 24, p. 7752-7759, 2009.
- LEITE, A. A. L. et al. Comportamento de dois genótipos de milho cultivados em sistema de aléias pré-estabelecidos com diferentes leguminosas arbóreas. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 875-882, 2008.
- LEITE, A. M. L.; FERRAZ JÚNIOR, A. S. L. **Competição entre genótipos de milho e leguminosas arbóreas em sistema de cultivo em aléias**. Rio de Janeiro: FERTIBIO, 2002.

LEMMENS, R. H. M. J.; SOERIANEGARA, I.; WONG, W. C. **Plant resources of South-East Asian**° 5(2) **Timber trees: minor commercial timbers**. Leiden: Backhuys, 1995. 655 p.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, 2009.

LIMA, H. C. et al. *Fabaceae*. In: FORZZA, R. C. et al. (Ed.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

LINDSTRO, K. et al. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 6, p. 453-463, June 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MAKKAR, N. S.; CASIDA JUNIOR, L. E. *Cupriavidusnecator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 323-326, 1987.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 357, n. 1/2, p. 289-307, 2012.

MCINROY, S. G. et al. Characterisation of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog™ and partial 16S rRNA sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 111-117, 1999.

MELCHOR-MARROQUÍN, J. I. et al. Screening *Rhizobium* spp. strains associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, Mexico. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 46, n. 1, p. 25-38, 1999.

MOAWAD, H.; BOHLOOL, B. B. Characterization of rhizobia from *Leucaena*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 387-392, 1992.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

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

MOREIRA, F. M. S.; PEREIRA, E. G. Microsymbionts: Rhizobia. In: SWIFT, M.; BIGNELL, D. (Ed.). **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Bogor: International Centre for Research in Agroforestry, 2001. p. 19-24.

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

MOURA, E. G. **Atributos de fertilidade de um podzólico vermelho amarelo da formação Itapecuru limitantes da produtividade do milho**. 1995. 91 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

MOURA, E. G. et al. Contribution of legume tree residues and macrofauna to the improvement of abiotic soil properties in the eastern Amazon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 86, p. 91-99, Oct. 2015.

MOURA, E. G. et al. The importance of an alternative for sustainability of agriculture around the periphery of the Amazon rainforest. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, Taipei, v. 5, n. 1, p. 70-78, 2013.

NAKAGAWA, Y.; SAKANE, T.; YOKOTA, A. Transfer of “*Pseudomonas riboflavina*” (Foster 1944), a Gram-Negative, Motile Rod with Long-Chain 3-Hydroxy Fatty Acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom.

rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, n. 1, p. 16-22, 1996.

NASCIMENTO, J. T.; SILVA, I. F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para uso como cobertura de solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 947-949, 2004.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Taxonomy**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 28 abr. 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Mangium and other fast-growing acacias for the humid tropics**. Washington: National Academy, 1983. 62 p.

NGOM, A. et al. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

NGUYEN, T. M.; KIM, J. *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 1-10, May 2015.

NUSWANTARA, S. et al. Phylogeny of bacterial symbionts of the leguminous tree *Acacia mangium*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, n. 6, p. 511-518, 1997.

PATT, T. E.; COLE, G. C.; HANSON, R. S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 26, n. 2, p. 226-229, 1976.

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. H. **Madeiras nativas**: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 1997. 438 p.

PÉREZ-RAMIREZ, N. O. et al. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 289-296, 1998.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.

PERRINEAU, M. M. et al. Differing courses of genetic evolution of *Bradyrhizobium* inoculants as revealed by long-term molecular tracing in *Acacia mangium* plantations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 18, p. 5709-5716, 2014.

PERRINEAU, M. M. et al. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 5, p. 376-384, 2011.

PORROTA, J. A.; TURNBULL, J. W.; JONES, N. Catalyzing native Forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 99, p. 1-7, 1997.

PORTELA, R. C. Q.; SILVA, I. L.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Crescimento inicial de mudas de *Clitoria fairchildiana* Howard e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. em diferentes condições de sombreamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 163-170, 2001.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 4, n. 5, p. 559-566, Oct. 2000.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2006. 34 p. (Documentos, 216).

RIVAS, R. et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 47-53, 2003.

RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino primário de leguminosas com diferentes velocidades de movimento foliar. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 709-720, out./dez. 2006.

ROSSI, L. M. B.; AZEVEDO, C. P.; SOUZA, C. R. *Acacia mangium*. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2003. 29 p. (EMBRAPA Amazônia Ocidental. Documentos, 28).

SANGINGA, N.; VANLAUWE, B.; DANSO, S. K. A. Management of biological N₂ fixation in alley cropping system: estimation and contribution to N balance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 174, p. 119-141, 1995.

SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M. A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 173-178, fev. 2003.

SHARMA, R. S. et al. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 1, p. 57-67, 2005.

SHELTON, H. M.; BREWBAKER, J. L. *Leucaena leucocephala*-the most widely used forage tree legume. In: MATHISON, G. W. (Ed.). **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 21-33.

SILVA, B. M. D. S.; MORO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* RA Howard.- Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 195-201, 2008.

SILVA, K. da et al. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 3, p. 175-182, 2012.

SILVA JÚNIOR, E. M. **Eficiência de rizóbios para feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em áreas de agricultura familiar na Pré-Amazônia maranhense**. 2009. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009.

SILVA JÚNIOR, M. C.; SACRANO, F. R.; SOUZA, C. F. Regeneration of an Atlantic Forest formation in the understory of a *Eucalyptus grandis* plantation in Southeast em Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 11, p. 147-152, 1995.

SIMONS, A. J.; STEWART, J. L. *Gliricidia sepium*-a multipurpose forage tree legume. In: _____. **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 34-49.

- SINCLAIR, M. J.; EAGLESHAM, A. R. J. Serological diversity of *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) from three West African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, n. 1, p. 69-74, 1990.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum, 2005. 640 p.
- SPRENT, J. I. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 401-407, 1995.
- SPRENT, J. I.; PARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 183-196, 2000.
- SWELIM, D. M. et al. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia*, and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 224-232, 1997.
- SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.
- SZOTT, L. T.; PALM, C. A.; SANCHEZ, P. A. Agroforestry in acid soils of humid tropics. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 45, p. 275-301, 1991.
- THIAO, M. et al. Diversity and effectiveness of rhizobial strains from *Gliricidia sepium* native to Reunion Island, Kenya and New Caledonia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 703-709, 2004.
- TIAN, G.; KANG, B. T.; BRUSSAARD, L. Biological effects of plant residues with contrasting chemical compositions under humid tropical conditions-decomposition and nutrient release. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, n. 10, p. 1051-1060, 1992.
- TIMMERS, A. C.; AURIAC, M.; TRUCHET, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, Cambridge, v. 126, n. 16, p. 3617-3628, 1999.
- TRUJILLO, M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

TURK, D.; KEYSER, H. H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 451-460, 1992.

VALLADARES, G. S.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C. dos. Adsorção de fósforo em solos de argila de atividade baixa. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 111-118, 2003.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

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

VITOUSEK, P. M. et al. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 368, n. 1621, p. 2013-2019, 2013.

WANG, E. T. et al. Diverse *Mesorhizobium plurifarium* populations native to Mexican soils. **Archives of Microbiology**, New York, v. 180, n. 6, p. 444-454, 2003.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 711-724, 1999.

WANG, F. Q. et al. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 6, p. 502-517, 2006.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. **Advances in Legume Systematics**, Kew, v. 10, p. 5-35, Dec. 2003.

XU, K. W. et al. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, New York, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstoniapickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstoniasolanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstoniaeutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, New York, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

YOUNG, J. M. et al. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2001.

ZAVARZIN, G. A. Budding bacteria. **Mikrobiologiya**, Oktyabrya, v. 30, p. 952-975, 1961.

ZHANG, X. et al. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 1, p. 104-113, 1991.

ZURDO-PIÑEIRO, J. L. et al. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 4, p. 469-477, 2004.

ZURDO-PIÑEIRO, J. L. et al. *Ochrobactrumcytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, n. 4, p. 784-788, 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 – SYMBIOSIS OF RHIZOBIA WITH *Clitoria fairchildiana*
AND *Gliricidia sepium* IN OXISOL IN THE PRE-AMAZON REGION OF
MARANHÃO**

Formatado de acordo com as normas para submissão da revista Bragantia

Katia Pereira Coelho¹, Paula Rose de Almeida Ribeiro², Emanuel Gomes de Moura³, Alana das Chagas Ferreira Aguiar⁴, Tainara Louzada Rodrigues⁵, Fatima Maria de Sousa Moreira^{6*}

1- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras-UFLA, bolsista FAPEMA. 2- Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo -UFLA, bolsista PACSS/CAPES. 3- Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, Bolsista CNPq, nível 2. 4- Universidade Federal do Maranhão-UFMA, Bolsista CNPq, nível 2. 5- Universidade Federal de Lavras, bolsista CAPES/FAPEMIG. 6- Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo - UFLA, bolsista CNPq, nível 1A. *Corresponding author: fmoreira@dcs.ufla.br

ABSTRACT: The legume trees gliricidia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.) and sombreiro (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard) have been recommended for agroforestry systems, and to be used in degraded areas, reforestation and other purposes. Despite the importance of these legume species, little is known regarding native populations that nodulate these species, including those of the pre-Amazon region of the state of Maranhão. The objective of this study was to evaluate the phenotypic and genetic diversity of nitrogen fixing bacteria species that nodulate gliricidia and sombreiro in alley cropping systems located in the pre-Amazon region of Maranhão, and to authenticate the nodulation ability of these strains in the promiscuous species siratro (*Macropodium atropurpureum*). Sampling was carried out in an alley cropping system in Maranhão. Nodules were collected in 20 gliricidia plants and 20 sombreiro plants. It was carried out isolation, cultural characterization, 16S rRNA gene partial sequencing, and authentication of the symbiotic ability of bacterial strains with siratro under axenic conditions. The authentication experiment was carried out in a greenhouse in long neck bottles (500 mL), with sterile nutrient solution, in a completely randomized design with three replications. Despite being under the same climatic and soil conditions, gliricidia and sombreiro are colonized by distinct rhizobia groups, with greater predominance of strains of the *Rhizobium* genus in gliricidia, and *Bradyrhizobium* genus in sombreiro. Endophytic strains of eight genera were found colonizing gliricidia and sombreiro nodules. Most part of *Rhizobium* strains did not nodulate siratro, while all *Bradyrhizobium* strains nodulated siratro. All native strains of the pre-Amazon region of Maranhão isolated from gliricidia presented low efficiency in siratro, and only four strains isolated from sombreiro were efficient in siratro.

Keywords: *Papilionoideae*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Clitoria fairchildiana*, *Gliricidia sepium*

INTRODUCTION

The pre-Amazon region of Maranhão is characterized by presenting high temperatures and rainfall, which combined with fragile soils derived from sedimentary rocks result in unfavorable conditions for the maintenance of sustainable agricultural systems. The alley cropping system is a propose to overcome these problem, in which legume trees are intercropped with agricultural crops, and are periodically pruned for the use of the branches as mulch and green manure. Two legume trees have been recommended for this system in this region, gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.) and sombreiro (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard), for having rapid growth, high biomass production, rusticity and ability of biological nitrogen fixation (BNF).

BNF can be carried out by free-living, associative or symbiotic bacteria. Among the symbiotic bacteria, nitrogen-fixing leguminosae nodulating bacteria (NFLNB), also known as rhizobia, stand out for their economic and ecological importance. BNF occurs in structures known as "nodules" in the roots, or in some cases, in the stems of legume plants. Inside the nodule, bacteria transform atmospheric N_2 into ammonia (NH_3), which is an assimilable form of nitrogen by the plant, supplying total or partially the N demand by crops. Gliricidia and sombreiro are legume species able to establish symbiosis with rhizobia, and thus they have great capacity to be used for the recovery of areas with poor or degraded soils.

Gliricidia is a medium size legume tree which occurs in abundance throughout its natural distribution area in Mesoamerica, and is of great commercial and economic interests for tropical regions, since they present several characteristics, such as crop shading, firewood, hedges, animal forage, green manure, soil stabilization and agroforestry systems (Simons and Stewart, 1994). Sombreiro is native from Brazil, and occurs mainly in the dense ombrophilous forest in the Amazon, in secondary formations, but it may also

occur in open, disturbed areas (Ducke, 1949). This species is widely used in agroforestry systems and landscaping, and presents potential to be used in the recovery of degraded areas (Aguiar et al., 2010).

Despite the importance of gliricidia and sombreiro for agroforestry and soil recovery of degraded soils, the pre-Amazon region lacks information on the symbiotic ability and diversity of NFNB native populations of these legume species. The objective of this study was to evaluate the phenotypic and genetic diversity of nitrogen-fixing nodulating bacteria in gliricidia and sombreiro in an alley cropping system located in the pre-Amazon region of Maranhão, and to authenticate the nodulation ability of these strains in siratro (*Macropitilium atropurpureum*).

MATERIAL AND METHODS

Area characterization and nodules sampling

Nodules collection was carried out in the village Acampamento, located in the municipality of Brejo - MA, in the pre-Amazon region of Maranhão (lat. 3° 38' S, long. 42°58' W), in a 1.41 ha alley cropping system. The climate is classified as Aw (Köppen), hot and humid equatorial. The soil is classified as Oxisol, with the following chemical characteristics: M.O (g/dm³): 30.6; pH (CaCl₂): 4.7; P (resin), K, Ca, Mg, H+Al and Al: 20.2; 0.92; 26.5; 9.6; 54.8 and 2.1 mg/dm³, respectively. No inoculant was used in the area. Thus, rhizobia populations can be considered native.

For the establishment of the alley cropping system, it was carried out liming with 2 t ha⁻¹ corrective with *total neutralization relative power* equal to 50%, and fertilization with 300 kg ha⁻¹ triple superphosphate. In 2011, the legume trees *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildia* were planted in the area spaced 2.5 x 0.5 m between plants, in 42 x 70 m plots. One plot was left without

the legume plants (Figure 1). An intercrop of these species with agricultural crops of mulato grass (*Brachiaria hybrida* cv. *Mulato*) and corn (cv AG 7088) started in 2013. These cultures received fertilization with 400 kg ha⁻¹ NPK 04-20-20 + 7 kg Zn ha⁻¹, and fertilization topdressing, at 15 and 40 days after corn planting with 40 kg ha⁻¹ N in the form of urea. Thirty-six kg ha⁻¹ of K₂O in the form of potassium chloride were also applied in the first topdressing.

Nodules collection was carried out in June 2014, and at least 10 nodules per plant were collected in 40 plants (20 sombreiro and 20 gliricidia). Nodules were washed in running water, dried on paper towels and packed in hermetically sealed vials containing cotton and silica gel for the storage until their use. In the field, five nodules of each species were evaluated for internal color and all nodules were red.

Isolation and phenotypic characterization of strains

For isolation, nodules were hydrated in sterile distilled water for 30 minutes, and then disinfected in alcohol for 30 seconds, in sodium hypochlorite (3%) for 3 minutes, and washed six times in sterile distilled water. The nodules were subsequently macerated in plates containing 79 culture medium (Fred and Waksman, 1928), also known as YMA (Vincent, 1970). This medium contained bromothymol blue and was at a pH of 6.8. The material was spread in streaks to obtain single colonies, and the bacteria were left to grow at 28 °C. Pure colonies were harvested and characterized morphologically.

Isolation was carried out until the obtainment of about 40 strains per species by the choice of the biggest nodules. Cultural characterization was carried out on culture medium 79 with bromothymol blue. The following characteristics were analyzed: time of growth - fast (1-3 days), intermediate (4-5 days), slow (6-10 days); and pH change (acid, alkaline, or neutral). According to this characterization, 25 gliricidia strains and 20 sombreiro strains,

representatives of the obtained phenotypic groups, were selected for identification by 16S rRNA gene partial sequencing and authentication in siratro.

DNA extraction and 16S rRNA gene partial sequencing

Strains selected for 16S rRNA gene partial sequencing were grown at 28 °C in solid medium 79. After confirmation of the purity of the strains, DNA extraction was carried out using the alkaline lysis method (Niemann et al., 1997).

The 16S rRNA gene partial amplification, primers, conditions of the cycle, and sequencing were the same as those used by Costa et al. (2013). The quality of the sequences was analyzed by the BioNumerics version 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, USA) software. Sequences were compared with those deposited in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information - NCBI) using the BLAST.

Authentication and efficiency of strains

Strains selected for sequencing were also subjected to authentication using siratro (*Macroptilium atropurpureum*), which is a highly promiscuous species, with rapid growth and easy handling. Surface scarification and disinfection was carried out by immersing the seeds in H₂SO₄ for 20 minutes, followed by several washes with sterile distilled water, and subsequent soaking in sterile distilled water for 30 minutes. Seeds were germinated in petri dishes with cotton and sterilized filter paper, soaked in sterile distilled water.

The experiment was carried out for 45 days in a greenhouse in a completely randomized design with three replications. The treatments were: control without inoculation and with low mineral N concentration (5.25 mg L⁻¹); control without inoculation and with high mineral N concentration (52.5 mg L⁻¹); controls

inoculated with reference strains for siratro UFLA04-212 (*Bradyrhizobium* sp.) with efficiency in siratro (Florentino et al., 2009), and SEMIA 656 (*Bradyrhizobium* sp.), authorized by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply for the production of inoculants for siratro and low mineral N concentration; treatments inoculated individually with the studied strains, all receiving low mineral N concentration. The experiment was carried out in long neck bottles (500 mL) containing sterile Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950) at ¼ strength, sterile.

At the end of the experiment, it was evaluated: number of nodules (NN), nodules dry matter (NDM), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), and relative efficiency compared to the treatment with high mineral N concentration (RENC). RENC was calculated according to the formula: RENC (%) = SDM of the treatment inoculated with the strain / SDM of the treatment with high N x 100 concentration.

From strains with positive nodulation, it was separated two nodules per treatment for reisolation for comparison of phenotypic characteristics in relation to the inoculated strain.

To meet the statistical assumptions, the growth parameters SDM, NDM and NN of gliricidia at the first stage were transformed by $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$. At the second stage, all growth parameters of gliricidia were transformed by $\sqrt{X+0.5}$. For sombreiro, SDM, R/S, NDM and NN were transformed by $\sqrt{X+0.5}$ at the first stage, and NDM, at the second stage. Treatments means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability, using the Sisvar 5.3 statistical analysis software (Ferreira, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and phenotypic characterization of strains

All nodules used for isolation were visually healthy, with red internal color. It was obtained a total of 83 strains: 42 from gliricidia and 41 from sombreiro. According to the phenotypic characterization, it is observed that strains isolated from gliricidia nodules presented only three phenotypes, all of them of rapid growth with acid, neutral or alkaline reaction, and neutral and acid reaction were predominant in the medium 79 with bromothymol blue (Figure two). Strains isolated from sombreiro nodules presented greater phenotypes variety. Among these strains, it was observed seven distinct phenotypes which include fast, intermediate and slow growth, and the three pH reactions, with predominance of intermediate growth and alkaline reaction in medium 79 with blue bromothymol (Figure 2).

Phenotypic characterization of gliricidia strains showed low diversity. The predominance of fast growth and neutral or acid reaction among the gliricidia strains isolated from nodules is due to the large number of strains genetically identified in the genus *Rhizobium*, in which these characteristics stand out, and the presence of endophytes which usually have fast growth (Jaramillo et al., 2013).

The establishment of gliricidia symbiosis with only fast-growth rhizobia has been previously reported by several authors, and it has been proposed that effective symbiosis in gliricidia occurs preferentially with strains of this type (Turk and Keyser, 1992; Moreira et al., 1993; Melchor-Marroquin et al., 1999; Thiao et al., 2004; Florentino et al., 2014). However, these authors did not genetically identify these strains.

The greatest amount of slow-growth strains among sombreiro isolates corroborates their identification in the *Bradyrhizobium* genus. However, Moreira

et al., (1993) reported strains of fast and slow growth in sombreiro planted in different substrates in nursery.

Identification by 16S rRNA gene partial sequencing

Forty-three strains were selected for identification by 16S rRNA gene partial sequencing (25 gliricidia and 18 sombreiro). For gliricidia, most strains belong to the *Rhizobium* genus; however, native *Mesorhizobium* sp. and *Methylobacterium* sp. were also isolated (Table 1). Strains not recognized as nodulating strains were also found colonizing gliricidia nodules, and they belong to the following genera: *Massilia*, *Klebsiella*, *Cryseobacterium*, *Bacillus* and *Bosea* (Table 1). Strains isolated from the field, nursery and under controlled conditions had already been identified as *Rhizobium* in southeastern Brazil (Moreira et al., 1998), and by other authors from different countries and continents (McInroy et al., 1999; Bala and Giller, 2001; Zurdo-Piñeiro et al., 2004; Degefu et al., 2013). Fast-growth strains of other genera, such as *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Alorhizobium*, and/or *Agrobacterium*, besides *Rhizobium*, have also been found by other authors in other countries (Acosta-Durán and Martínez-Romero, 2002; Bala et al., 2003; Bala and Giller, 2006) and by Moreira et al., (1998) in Brazil; however, only *Mesorhizobium* was found in this work. This is the first report on the occurrence of *Methylobacterium* in gliricidia nodules.

All strains found establishing symbiosis with sombreiro belong to the *Bradyrhizobium* genus (Table 2). The other identified strains are not recognized as nodulating, and are distributed in the genera *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* and *Leifsonia* (Table 2). The presence of *Bradyrhizobium* genus in the nodules of this legume cultivated in different substrates in the nursery has been previously reported (Moreira et al., 1993; Moreira et al., 1998). However, *Burkholderia* was also identified by 16S rRNA

sequencing in BR8005 and BR8006 strains (Moreira, 2008) identified as *Rhizobium* by Moreira et al., (1993), based on a profile analysis of total protein at a time when there were only three rhizobia genera with distinct cultural characteristics. Nevertheless, *Burkholderia* was not found in the present work.

Strains of the *Bacillus* and *Paenibacillus* genera have been found in nodules of legume plants and are considered endophytic, although their role has not been fully elucidated yet. Studies have demonstrated that strains of the *Bacillus* genus present coexistence capability with *Bradyrhizobium* in nodules, besides the capacity of nodulation and BNF (Li et al., 2008; Costa et al., 2013). It has been demonstrated that bacteria belonging to the genera *Arthrobacter* and *Klebsiella* are found in the rhizosphere in association with the roots, or living freely in the soil, and present increased ability to promote plant growth (Kloepper et al., 1989; Glick, 1995). In addition, *Arthrobacter sp.* may be associated with senescent nodules and may influence nitrogen loss in these nodules (Webb et al., 2010). On the other hand, the genera *Bosea*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella* and *Massilia* can act as growth promoters in plants by means of phosphate solubilization, phytohormones production, among other processes (Chen et al., 2006; Shiraishi et al., 2010; Marra et al., 2012). The genus *Leifsonia*, in turn, comprises endophytic bacteria found in plant roots, such as in ginseng (Qiu et al., 2007). However, none of the endophytic strains isolated from nodules of gliricidia or sombreiro stimulated growth in siratro.

Both phenotypic characterization and identification by 16S rRNA gene partial sequencing shows that gliricidia and sombreiro are colonized by different NFLNB groups. Thus, it is verified that the nodule occupancy by *Rhizobium* or *Bradyrhizobium* strains was exclusively determined by the host. Considering that both legume trees were sampled in the same area, it can be inferred that this behavior is related to host specificity of the legume species with strains of the native NFLNB community.

Authentication and efficiency of strains

In both experiments, controls with low mineral N concentration and without inoculation did not nodulate at any stage, indicating absence of contamination in the experiments. Controls with high mineral N concentration showed values superior ($p < 0.05$) to all the tested strains and to the other controls for SDM, RDM and RENC in both stages (Tables 1 and 2).

Considering SDM, RDM and RENC, no isolated gliricidia strain was efficient in N_2 fixation with siratro, since all values were similar ($p > 0.05$) to that of the control with low mineral N concentration for the above mentioned parameters (Table 1). The R/S ratio for most of the tested strains was superior ($p < 0.05$) to the controls with high mineral N concentration, to the controls inoculated with the reference strains, and to the strains UFLA01-889, UFLA01-891, UFLA01-887 and UFLA01-902. No strain showed similar nodulation ($p > 0.05$) to that of the reference strains. Regarding the 17 *Rhizobium sp.* strains, only seven nodulated siratro, and *Mesorhizobium sp.* strain did not nodulate. Strains of species which are not recognized as nodulating presented negative nodulation, as expected (Table 1).

Regarding SDM and RENC in sombreiro, the strains UFLA01-960, UFLA01-976, UFLA01-980 and UFLA01-985, which belong to the *Bradyrhizobium* genus and the reference strains showed efficiency superior ($p < 0.05$) to the other strains (Table 2). For R/S, eight of the 18 tested strains were similar ($p > 0.05$) to the controls with low mineral N concentration. The other strains presented values superior ($p < 0.05$) to the controls with high mineral N concentration and to the reference strains (Table 2). For NDM and NN, several strains were similar ($p > 0.05$) to the reference strains. All strains not recognized as nodulating had negative nodulation, except for UFLA01-971, which was identified in the *Arthrobacter* genus. For RDM, only UFLA01-980 strain had values similar ($p > 0.05$) to those of the reference strains. The

remaining strains showed values similar ($p>0.05$) to the controls with low mineral N concentration (Table 2).

Siratiro species was used for authentication of the strains regarding their nodulation ability, since it is a promiscuous species, i.e., it is able to nodulate with various rhizobia genera and species (Lima et al., 2009), and it also produces abundant amount of seeds in several seasons, which are viable for long periods. Besides, siratro seeds and plants are easy to be managed in greenhouse. This is not the case of the studied species, whose seeds are not available in all seasons and which lose viability quickly. Although several studies have authenticated gliricidia strains in their original host (Florentino et al., 2014; Bala and Giller, 2006; Turk and Keyser, 1992; McIroy et al., 1999; Melchor-Marroquim et al., 1999; Acosta-Durán and Martinez-Romero, 2002; Thiao et al., 2004), no studies have been found in sombreiro in which the strains were authenticated in this species, nor works which analyzed *Nif* and *Nod* genes in strains of both species. Although siratro is able to nodulate with strains of all nodulating genera found in the present work, the legume nodulated with all the strains coming from sombreiro nodules, (belonging to *Bradyrhizobium* genera), but it did not nodulate with some *Rhizobium* strains, or with the *Methylobacterium* strain isolated from gliricidia, nor with the *Mesorhizobium* strain isolated from gliricidia. These results demonstrated that siratro use as species for authentication of strains is relatively limited, since it does not nodulate with all species/strains of the same genus, for example, *Rhizobium* and *Mesorhizobium*. Nodulation in siratro allowed authenticating various strains as able to nodulate; however, the low efficiency of these strains with siratro cannot be extrapolated for their relationship with the original host, which should be investigated in further studies.

The absence of nodulation with most endophytic strains was expected since there are few reports of nodulation for these genera, and usually, these

studies did not present conclusive data. Positive nodulation with a strain of the *Arthrobacter* genus can be explained by a possible horizontal transfer of genes, which encode nodulation of rhizobia species in the soil (Shiraishi et al., 2010). However, this fact should be better investigated.

CONCLUSIONS

Gliricidia and sombreiro are colonized by distinct rhizobia groups. Gliricidia nodulated preferably with rapid-growth strains of the *Rhizobium* genus, while sombreiro nodulates with strains of the *Bradyrhizobium* genus.

Endophytic strains of the genera *Cryseobacterium*, *Massilia*, *Bacillus*, *Bosea*, and *Klebsiella* were found in gliricidia nodules, while the genera *Klebsiella*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter* and *Leifsonia* were found in sombreiro nodules. Among these strains, one of the *Arthrobacter* genus presented positive nodulation in siratro.

This is the first report on isolation of *Methylobacterium* in gliricidia nodules.

All native strains of the pre-Amazon region of Maranhão isolated from gliricidia showed low efficiency in siratro, and only four strains isolated from sombreiro were efficient in siratro.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors thank the Foundation for Research and Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support. The authors also thank Dr. Antonia Alice C. Rodrigues and all the team of the Phytopathology Laboratory of the State University of Maranhão (UEMA); Dr. Orlando Carlos Huertas Tavares; and the students and professors of the Federal University of Maranhão (UFMA) - Chapadinha, and of PPG in

Agroecology-UEMA, who assisted in the work field collection and strains isolation.

REFERENCES

- Acosta-Durán, C., & Martínez-Romero, E. (2002). Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology*, 178, 161-164. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-002-0433-3>
- Aguiar, A. C. F., Freitas, I. C., Carvalho, C. S., Monroe, P. H. M., & Moura, E. G. (2010). Efficiency of an agrosystem designed for family farming in the pre-Amazon region. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 26, 24-30. <http://dx.doi.org/10.1017/S1742170510000396>
- Bala, A., Murphy, P., & Giller, K. E. (2003). Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. *Molecular Ecology*, 12, 917-929. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01754.x>
- Bala, A., & Giller, K. E. (2001). Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. *New Phytologist*, 149, 495-507. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00059.x>
- Bala, A., & Giller, K. E. (2006). Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 76, 319-330. <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-005-2003-y>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 33-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Costa, E. M, Nóbrega, R. S. A, Carvalho F., Trochmann A., Ferreira, L. D. V. M., & Moreira, F. M. S. (2013). Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 1275-1284. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>
- Degefu, T., Wolde-Meskel, E., & Frostegard, A. (2013). Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 272-280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.004>

Ducke, A. (1949). Notas sobre a flora neotrópica–II: as leguminosas da Amazônia Brasileira. Belém: Instituto Agrônômico do Norte. 247p. Boletim técnico, 18.

Ferreira, D.F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Florentino, L. A., Guimarães, A. P., Rufini, M., Silva, K., & Moreira, F. M. S. (2009). *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Scientia Agricola*, 66, 667-676. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>

Florentino, L.A., Rezende, A.V., Mesquita, A.C., Lima, A.R., Marques, D.J., & Miranda, J.M. (2014). Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. *Revista de Ciências Agrárias*, 37, 320-338.

Fred, E. B., & Waskman, S. A. (1928). Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal Microbiology*, 41, 109–114. <http://dx.doi.org/10.1139/m95-015>

Hoagland, D. R., & Arnon, D. T. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California: Circular. California Agriculture Experiment Station.

Jaramillo, P. M. D., Guimarães, A. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., Nóbrega, R. S. A., & Moreira, F. M. S. (2013). Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Scientia Agricola*, 70, 397-404. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>

Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7, 39–43. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90057-7](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(89)90057-7)

Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 238-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.014>

Lima, A. S., Nóbrega, R. S. A., Barberi, A., da Silva, K., Ferreira, D. F., & Moreira, F. M. S. (2009). Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant and Soil*, 319, 127-145. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-008-9855-2>

Marra, L. M., Soares, C. R. F. S., Oliveira, S. M., Ferreira, P. A. A., Soares, B. L., Fráguas Carvalho, R., Lima, J. M., & Moreira, F. M. S. (2012). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357, 289-307. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1157-z>

McInroy, S. G., Campbell, C. D., Haukka, K. E., Odee, D. W., Sprent, J. I., Wang, W. J., & Sutherland, J. M. (1999). Characterisation of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog™ and partial 16S rRNA sequencing. *FEMS microbiology letters*, 170, 111-117. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13362.x>

Melchor-Marroquín, J. I., Vargas-Hernandez, J. J., Ferrera-Cerrato, R., & Krishnamurthy, L. (1999). Screening *Rhizobium* spp. strains associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, Mexico. *Agroforestry systems*, 46, 25-38. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006231629500>

Moreira, F. M. S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., & Franco, A. A. (1993). Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 135-146. [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80258-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80258-4)

Moreira, F. M. S., Haukka, K., & Young, J. P. W. (1998). Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, 7, 889-895. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00411.x>

Moreira, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira, & L. Brussaard. (Org.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008, p. 621-680.

Niemann, S., Puehler, A., Tichy, H. V., Simon, R., & Selbitshka, W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 477-484. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00141.x>

Qiu, F., Huang, Y., Sun, L., Zhang, X., Liu, Z., & Song, W. (2007). *Leifsoniaginengi* sp. nov., isolated from ginseng root. *International Journal of Systematic*

and Evolutionary Microbiology, 57, 405–408.
<http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.64487-0>

Shiraishi, A., Matsushita, N., & Hougetsu, T. (2010). Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. Systematic and applied microbiology, 33, 269-274.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005>

Simons, A. J., & Stewart, J. L. (1994). *Gliricidia sepium* a Multipurpose Forage Tree Legume. In R. C. Gutteridge & H. M. Shelton (Eds.). Forage tree legumes in tropical agriculture. Wallingford: Cab International.

Thiao, M., Neyra, M., Isidore, E., & Sylla, S. (2004). Diversity and effectiveness of rhizobial strains from *Gliricidia sepium* native to Reunion Island, Kenya and New Caledonia. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 703-709. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-2562-0>

Turk, D., & Keyser, H. H. (1992). Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. Canadian Journal of microbiology, 38, 451-460. <http://www.dx.doi.org/10.1139/m92-076>

Zurdo-Piñeiro, J. L., Velázquez, E., Lorite, M. J., Brelles-Mariño, G., Schröder, E. C., Bedmar, E. J., & Martínez-Molina, E. (2004). Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. Systematic and applied microbiology, 27, 469-477. <http://dx.doi.org/10.1078/0723202041438437>

Webb, K. J., Jensen, E. F., Heywood, S., Morris, S. M., Linton, P. E., & Hooker, J. E. (2010). Gene expression and nitrogen loss in senescing root systems of red clover (*Trifolium pratense*). Journal of Agricultural Science, 148, 579–591. <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859610000420>

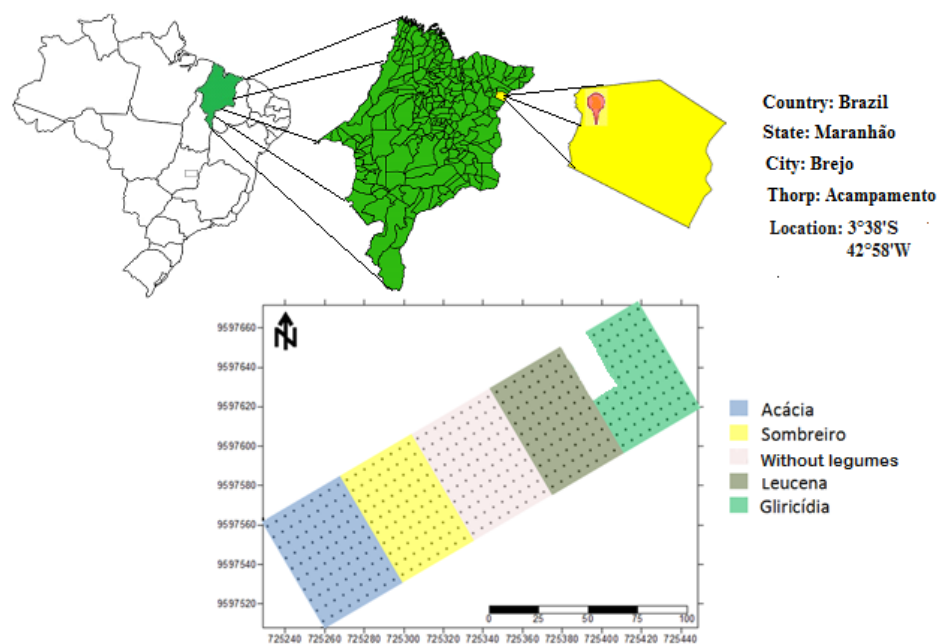


Figure 1. Location and sketch of the sampled experimental area. Different colors indicate legumes which make up the alley cropping system. In all the plots, legume trees are intercropped with corn and mulato grass; in the plot without legume, only corn and grass are cultivated. For this study, only gliricidia and sombreiro were sampled. Black dots are georeferenced and indicate the points where the soil samples are collected.

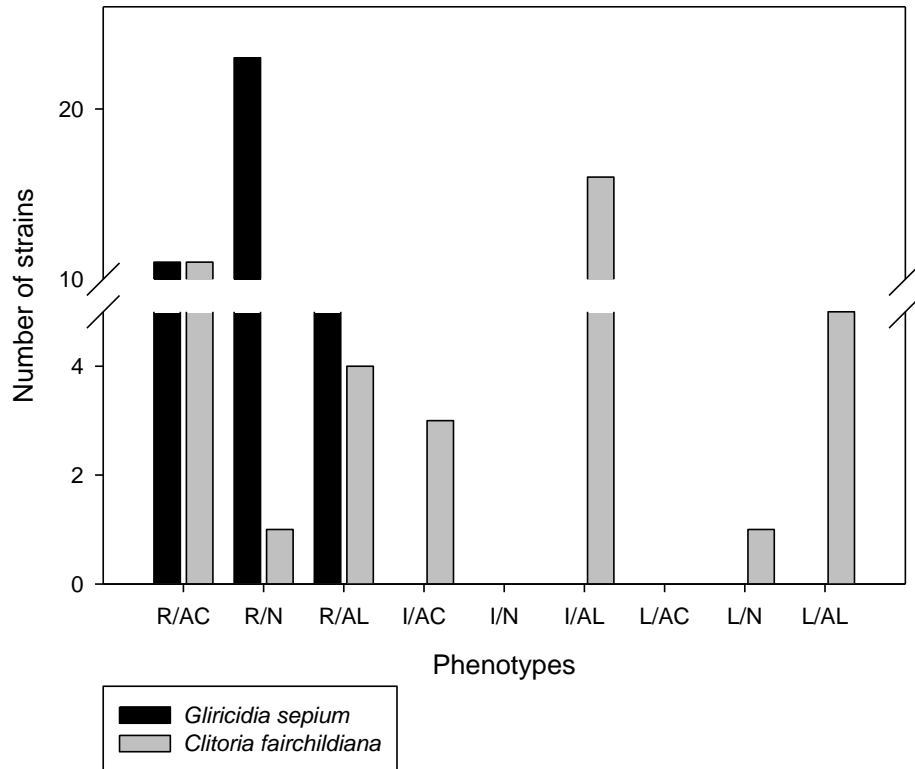


Figure 2. Phenotypic characteristics of strains isolated from nodules of *Gliricidia sepium* and *Clitoria fairchildiana* cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region of Maranhão. The following characteristics were analyzed: time of appearance of isolated colonies (R - fast: 1 to 3 days; I - Intermediate: 4 to 5 days; S - slow: 6 to 10 days); and pH of the reaction in medium 79 with bromothymol blue (AC-acid, N-neutral, AL-alkaline).

Table 1. Culture, identification based on 16S rRNA gene partial sequencing, and mean values of shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), root and shoot ratio (R/S), relative efficiency to the controls with high mineral N concentration (RENC), nodules dry matter (NDM), and number of nodules (NN) of bacterial strains isolated from *Gliricidia sepium* nodules cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region of Maranhão, and authenticated regarding nodulation in *Macropodium atropurpureum*. Two non-inoculated controls, one with high mineral N concentration (52.5 mg L⁻¹), and one with low mineral N concentration (5.25 mg L⁻¹), and two inoculated controls (UFLA 04-212 and SEMIA 656). Experiment divided into two stages. The sequences of the strains were compared based on the most similar sequences found in the GenBank.

Treatments	Nodulation ¹	Cultural Characteristics ²	16S rRNA extension (pb)	STAGE 1			SDM ³g/plant.....	RDM	R/S	RENC %	NDM ³ mg/plant	NN ³ Plant ⁻¹
				Most similar sequences found in the GenBank		Similarity (%)						
				Species	Accession number							
52.5 mg de N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0.65a ⁶	0.33a	0.51b	100a	0.000c	0b
5.25 mg de N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0.11d	0.12b	1.10a	18c	0.000c	0b
UFLA04-212 ⁵	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0.27b	0.18b	0.69b	41b	0.058a	29a
SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0.21c	0.11b	0.51b	33b	0.040b	30a
UFLA01-889	+	R/N	598*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.10d	0.09b	0.89b	15c	0.000c	2b
UFLA01-890	+	R/N	1236	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.10d	0.13b	1.27a	16c	0.001c	2b
UFLA01-891	-	R/AL	1322	<i>Massilia</i> sp.	JX566630.1	99	0.11d	0.10b	0.95b	17c	0.000c	0b
UFLA01-892	+	R/N	760*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.08d	0.13b	1.65a	13c	0.001c	6b
UFLA01-893	+	R/N	1293	<i>Rhizobium</i> sp.	KM253159.1	99	0.09d	0.11b	1.22a	14c	0.001c	2b
UFLA01-895	-	R/N	843*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.10d	0.12b	1.21a	15c	0.000c	0b
UFLA01-896	-	R/AC	564*	<i>Klebsiella</i> sp.	DQ316102.1	100	0.09d	0.12b	1.4a	14c	0.000c	0b

¹(+) presence and (-) absence of nodules in *M. atropurpureum*. ²Cultural characteristics in solid medium 79: time of appearance of isolated colonies: R-rapid (1-3 days); I-intermediate (4-5 days); S-slow (6-10 days); VS-very slow (over 10 days). pH reaction in medium 79 with bromothymol blue AC-acid; N-neutral; AL-alkaline. * forward sequence used only. ³Data transformed by $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$. ⁴Data transformed by $\sqrt{X+0.5}$. ⁵All strains received 5.25 mg N L⁻¹. ⁶Means followed by the same letter in the same column are not statistically different according to the Skott-Knott test at 5%.

Table 1. Continuation

Treatments	Nodulation ¹	Cultural Characteristics ²	16S rRNA extension (pb)	STAGE 2								
				Most similar sequences found in the GenBank			SDM ⁴	RDM ⁴	R/S ⁴	RENC	NDM ⁴	NN ⁴
				Species	Accession number	Similarity (%)g/plant.....	%	mg/plant	plant ⁻¹		
52.5 mg N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	1.36a ⁶	0.58a	0.43b	100a	0.000c	0b
5.25 mg N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0.11c	0.12c	1.13a	8c	0.000c	0b
UFLA 04-212 ⁵	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0.43b	0.23b	0.54b	32b	0.044b	36a
SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0.37b	0.15c	0.39b	27b	0.048a	32a
UFLA01-887	-	R/AL	439*	<i>Massilia</i> sp.	JX566630.1	99	0.08c	0.08c	0.86b	6c	0.000c	0b
UFLA01-888	-	R/AC	1324	<i>Chryseobacterium</i> sp.	JF327645.1	98	0.08c	0.12c	1.60a	6c	0.000c	0b
UFLA01-897	-	R/N	1313	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	88	0.11c	0.14c	1.36a	8c	0.000c	0b
UFLA01-898	-	R/N	795	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.09c	0.09c	1.07a	6c	0.000c	0b
UFLA01-900	+	R/N	1303	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855239.1	99	0.11c	0.14c	1.33a	8c	0.001c	2b
UFLA01-901	-	R/N	1266	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855163.1	99	0.12c	0.11c	0.98a	9c	0.000c	0b
UFLA01-902	-	R/AC	933*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855163.1	99	0.07c	0.07c	0.84b	5c	0.000c	0b
UFLA01-903	-	R/AC	683*	<i>Bacillus</i> sp.	KJ879598.1	100	0.11c	0.13c	1.32a	8c	0.000c	0b
UFLA01-905	+	R/N	1285	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855166.1	99	0.08c	0.10c	1.61a	6c	0.002c	4b
UFLA01-906	-	R/N	1292	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.10c	0.09c	0.95a	8c	0.000c	0b
UFLA01-907	-	R/N	1345	<i>Mesorhizobium</i> sp.	EU584257.1	98	0.12c	0.13c	1.09a	9c	0.000c	0b
UFLA01-908	+	R/N	856*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.11c	0.14c	1.25a	8c	0.001c	3b
UFLA01-909	-	R/AL	724*	<i>Bosea</i> sp.	JX566529.1	100	0.09c	0.11c	1.23a	7c	0.000c	0b
UFLA01-910	-	R/AC	1227	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.10c	0.14c	1.40a	8c	0.000c	0b
UFLA01-911	-	R/AC	1275	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	0.12c	0.13c	1.09a	9c	0.000c	0b
UFLA01-912	-	R/AC	1264	<i>Rhizobium</i> sp.	GU433459.1	99	0.11c	0.12c	1.14a	8c	0.000c	0b
UFLA01-913	-	R/AL	1253	<i>Methylobacterium</i> sp.	AM910533.1	99	0.10c	0.12c	1.27a	7c	0.000c	0b
UFLA01-899	-	R/N	1287	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

¹ (+) presence and (-) absence of nodules in *M. atropurpureum*. ²Cultural characteristics in solid medium 79: time of appearance of isolated colonies: R-rapid (1-3 days); I-intermediate (4-5 days); S-slow (6-10 days); VS-very slow (over 10 days). pH reaction in medium 79 with bromothymol blue AC-acid; N-neutral; AL-alkaline. *forward sequence used only. ³Data transformed by $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$. ⁴Data transformed by $\sqrt{X+0.5}$. ⁵All strains received 5.25 mg N L⁻¹ ⁶Means followed by the same letter in the same column are not statistically different according to the Skott-Knott test at 5%.

Table 2. Culture, identification based on 16S rRNA gene partial sequencing and mean values of shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), root and shoot ratio (R/S), relative efficiency to the controls with high mineral N concentration (RENC), nodules dry matter (NDM), and number of nodules (NN) of bacterial strains isolated from *Clitoria fairchildiana* nodules cultivated in an alley cropping system in the pre-Amazon region, and authenticated regarding nodulation in *Macroptilium atropurpureum*. Sequences of the strains were compared based on the most similar sequences found in the GenBank.

STAGE 1												
Treatments	Nodulation ¹	Cultural Characteristics ²	16S rRNA extension (pb)	Most similar sequences found in the GenBank	Accession number	Similarity (%)	SDM ³g/plant.....	RDM	R/S ³	RENC %	NDM ³ mg/plant	NN ³ Plant ⁻¹
52,5 mg N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0,65a ⁵	0,33a	0,51b	100a	0,000c	0c
5,25 mg N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0,11d	0,12b	1,10a	18d	0,000c	0c
UFLA 04-212 ⁴	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,27b	0,18b	0,69b	41b	0,059a	28a
SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,21c	0,11b	0,51b	33c	0,040b	30a
UFLA01-967	-	R/AC	624*	<i>Klebsiella</i> sp.	KF411348.1	99	0,07d	0,10b	1,34a	11d	0,000c	0c
UFLA01-968	-	R/AL	1357	<i>Bacillus</i> sp.	KF254678.1	100	0,10d	0,12b	1,17a	15d	0,000c	0c
UFLA01-969	-	R/N	698*	<i>Paenibacillus</i> sp.	KF750627.1	99	0,06d	0,10b	1,73a	9d	0,000c	0c
UFLA01-971	+	R/AC	308*	<i>Arthrobacter</i> sp.	FR745407.1	99	0,10d	0,10b	1,03a	15d	0,001c	4c
UFLA01-972	-	I/AC	577*	<i>Paenibacillus</i> sp.	EU571197.1	99	0,08d	0,12b	1,52a	13d	0,000c	0c
UFLA01-975	-	R/AC	905*	<i>Leifsonia</i> sp.	FR750300.1	99	0,11d	0,14b	1,24a	17d	0,000c	0c
UFLA01-982	-	I/AC	286*	<i>Leifsonia</i> sp.	FR750300.1	100	0,10d	0,12b	1,26a	15d	0,000c	0c
UFLA01-984	+	I/AL	1182	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KJ739927.1	100	0,15d	0,14b	0,89b	24d	0,038b	14b

¹(+) presence and (-) absence of nodules in *M. atropurpureum*. ²Cultural characteristics in solid medium 79: time of appearance of isolated colonies: R-rapid (1-3 days); I-intermediate (4-5 days); S-slow (6-10 days); VS-very slow (over 10 days). pH reaction in medium 79 with bromothymol blue AC-acid; N-neutral; AL-alkaline. * forward sequence used only. ³Data transformed by $\sqrt{X+0.5}$. ⁴All strains received 5.25 mg N L⁻¹. ⁵Means followed by the same letter in the same column are not statistically different according to the Skott-Knott test at 5%.

Table 2. Continuation

STAGE 2												
Treatments	Nodulation ¹	Cultural Characteristics ³	16S rRNA extension (pb)	Most similar sequences found in the GenBank			SDMg/plant.....	RDM	R/S	RENC %	NDM ² mg/plant	NN plant ⁻¹
				Species	Accession number	Similarity (%)						
52,5 mg de N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	1,36a ⁵	0,57a	0,42c	100a	0,000c	0c
5,25 mg de N L ⁻¹	-	---	---	---	---	---	0,11c	0,12c	1,13a	8c	0,000c	0c
UFLA 04-212 ⁴	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,43b	0,23b	0,54c	32b	0,043a	36a
SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,37b	0,15b	0,39c	28b	0,048a	32a
UFLA01-959	+	I/AL	1253	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KC677617.1	99	0,21c	0,09c	0,48c	15c	0,037a	42a
UFLA01-960	+	I/AL	784*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	99	0,24b	0,10c	0,44c	17b	0,029b	41a
UFLA01-961	+	I/AL	1233	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114645.1	99	0,12c	0,10c	0,83b	9c	0,030b	21b
UFLA01-963	+	I/AL	621*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF357613.1	100	0,10c	0,12c	1,14a	8c	0,016c	21b
UFLA01-964	+	I/AL	321 ¹	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KR779522.1	100	0,19c	0,09c	0,52c	14c	0,039a	44a
UFLA01-965	+	I/AL	792*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	99	0,10c	0,05c	0,50c	7c	0,011c	12b
UFLA01-976	+	I/AL	1222	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114634.1	99	0,31b	0,13c	0,41c	23b	0,064a	43a
UFLA01-980	+	I/AL	1220	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114634.1	99	0,34b	0,17b	0,49c	25b	0,071a	50a
UFLA01-981	+	ML/AL	804*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	JN085495.1	97	0,11c	0,10c	0,97b	8c	0,027b	32a
UFLA01-985	+	I/AL	770*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114645.1	100	0,27b	0,11c	0,40c	20b	0,029b	20b

¹(+) Presence and (-) absence of nodules in *M. atropurpureum*. ²Cultural characteristics in solid medium 79: time of appearance of isolated colonies: R-fast (1-3 days); I-intermediate (4-5 days); L-slow (6-10 days); ML-very slow (over 10 days). pH of the reaction medium 79 with bromothymol blue AC-acid; N-neutral; AL-alkaline. * forward sequence used only. ³Data processed by $\sqrt{X} + 0.5$. ⁴All strains received 5.25 mg N L⁻¹. ⁵Means with the same letter in the same column are not statistically different according to Skott-Knott test at 5%.

**ARTIGO 2 - SIMBIOSES DE RIZÓBIOS COM *Acacia mangium* E
Leucaena leucocephala NA PRÉ-AMAZÔNIA MARANHENSE**

Normas segundo a ABNT

**Katia Pereira Coelho¹, Paula Rose de Almeida Ribeiro², Alana das Chagas
Ferreira Aguiar³, Emanuel Gomes de Moura⁴, Tainara Louzada Rodrigues⁵,
Fatima Maria de Sousa Moreira⁶**

1-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - UFLA, bolsista FAPEMA. 2-Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo –UFLA, bolsista PACSS/Capes. 3-Universidade Estadual do Maranhão, bolsista CNPq, nível 2. 4-Universidade Federal do Maranhão, Bolsista CNPq, nível 2. 5-Universidade Federal de Lavras, bolsista CAPES/FAPEMIG. 6-Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo –UFLA, bolsista CNPq, nível 1A.

RESUMO

As leguminosas arbóreas acácia (*Acacia mangium*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) são amplamente utilizadas em sistemas agroflorestais ou agrossilvipastoris e na recuperação de áreas degradadas. Entretanto, a simbiose dessas leguminosas com rizóbios na região amazônica ainda é pouco estudada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade fenotípica e genética de bactérias fixadoras de N₂, isoladas de nódulos de acácia e leucena cultivadas na região da Pré-Amazônia maranhense, e sua capacidade simbiótica com plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*). A amostragem foi feita em um sistema de cultivo em aléias localizado em Brejo-MA. Amostraram-se 20 plantas de cada espécie, coletando-se 10 nódulos por planta. Realizou-se o isolamento, caracterização cultural, identificação e análise da capacidade simbiótica das estirpes bacterianas com siratro. O experimento de autenticação foi realizado em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, utilizando garrafas *long neck* (500 mL), preenchidas com solução nutritiva esterilizada. Obteve-se 19 estirpes dos nódulos de acácia e 41 de leucena. Foi realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para 13 e 23 estirpes de acácia e leucena, respectivamente. Acácia e leucena estabelecem simbiose com rizóbios fenotípica e geneticamente diferentes, com predomínio dos gêneros *Mesorhizobium* em leucena e *Bradyrhizobium* em acácia. Bactérias não simbióticas dos gêneros *Bacillus*, *Terriglobus*, *Paenibacillus* e *Kineococcus* foram encontradas colonizando nódulos de acácia, enquanto que os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus* estão presentes em nódulos de leucena. Estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* nodulam com siratro, mas são ineficientes em promover o seu crescimento.

Palavras-chave: *Mimosoideae*. Sistema de cultivo em aléias. *Bradyrhizobium*. *Mesorhizobium*.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), conhecidas popularmente como rizóbios, são capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com leguminosas. Esse processo ocorre em estruturas especializadas, denominadas nódulos, que podem estar presentes nas raízes ou, excepcionalmente, no caule de plantas hospedeiras. Os rizóbios são considerados microrganismos-chave por serem responsáveis pelo aporte de grande quantidade de nitrogênio nos solos. Esse processo pode gerar economia, por ser capaz de reduzir ou dispensar o uso de fertilizantes nitrogenados, além de evitar danos ambientais decorrentes do uso excessivo desses fertilizantes.

Leguminosas arbóreas têm sido utilizadas com sucesso em sistemas agroflorestais, agrossilvipastoris e na recuperação de áreas degradadas. No Maranhão, mais especificamente na região da pré-Amazônia, as condições edafoclimáticas constituem um entrave para a agricultura sustentável. Neste cenário a utilização de leguminosas arbóreas pode servir como estratégia para a obtenção de agrossistemas produtivos e ambientalmente adequados, principalmente para pequenos produtores, como é o caso do sistema de cultivo em aléias (AGUIAR et al., 2010; MOURA et al., 2013). A capacidade de fixação biológica de nitrogênio de algumas espécies é a característica mais benéfica para esses sistemas visto a possibilidade de aporte de nitrogênio, nutriente cuja disponibilidade é crítica e limitante especialmente no trópico úmido (CHISTENSEN, 2000). Outras características como rápido crescimento, elevada produção de biomassa e resistência a condições ambientais adversas são desejáveis nessas leguminosas. Entre as leguminosas arbóreas que possuem tais características e são indicadas para sistemas agroflorestais e recuperação de áreas degradadas na pré-Amazônia maranhense estão a acácia (*Acacia mangium*) e leucena (*Leucaena leucocephala*), ambas exóticas e pertencentes a subfamília

Mimosoideae (AGUIAR et al., 2009; MOURA et al., 2013). *Acacia mangium* Willd. possui elevada rusticidade, adaptação a condições ambientais adversas e elevada produção de biomassa. Já *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit é uma árvore de crescimento rápido que possui elevado teor de nitrogênio nas folhas e é considerada multifuncional.

A eficiência da FBN depende da espécie vegetal, da bactéria e das condições ambientais e os solos brasileiros apresentam alta diversidade de bactérias fixadoras de N₂, logo, a avaliação de comunidades nativas de BFNNL é necessária por ser capaz de indicar a necessidade de inoculação e consistir na fonte primária da busca por estirpes de rizóbios eficientes, competitivas e resistentes a condições ambientais desfavoráveis (GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2009; MARRA et al., 2012; MOREIRA et al., 1998). Poucos estudos têm sido conduzidos para investigar a diversidade e capacidade simbiótica de BFNNL na região pré-amazônica maranhense, inclusive com leucena e acácia, mesmo considerando o grande potencial destas leguminosas (COELHO, 2010; GUALTER et al., 2011; SILVA JÚNIOR, 2009). Deste modo, verifica-se a necessidade de mais avaliações da simbiose entre BFNNL e acácia e leucena na Pré-Amazônia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genética de bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas de nódulos de acácia e leucena, da região da pré-Amazônia maranhense, e sua capacidade simbiótica e eficiência com plantas de siratro, utilizadas para o teste de autenticação das estirpes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A área de estudo consiste num sistema de cultivo em aléias localizado no Povoado Acampamento - Município de Brejo – MA, Brasil (3° 38' de latitude sul e 42° 58' de longitude oeste). O clima da região, classificado segundo Köppen, é do tipo Aw, Equatorial quente e úmido. O solo da área experimental é um Oxisol cuja análise revelou as seguintes características químicas: M.O (g/dm^3): 30,6; pH (CaCl_2): 4,7; P (resina), K, Ca, Mg, H+Al e Al: 20,2; 0,92; 26,5; 9,6; 54,8 e 2,1 mg/dm^3 , respectivamente. Como nenhum tipo de inoculante foi aplicado na área, as populações de rizóbios podem ser consideradas nativas.

O sistema de cultivo em aléias é constituído de cinco parcelas iguais de 42,5 x 70 m, quatro delas semeadas com as leguminosas arbóreas sombreiro (*Clitoria fairchildiana*), leucena (*Leucaena leucocephala*), acácia (*Acacia mangium*), e gliricídia (*Gliricidia sepium*) no espaçamento de 2,5 x 0,5 m e uma testemunha, sem leguminosas (Figura 1). Para a implantação do sistema e plantio das leguminosas foi realizada a correção da acidez do solo com aplicação, em superfície, de 2 t ha^{-1} de um corretivo com PRNT igual a 50%. Além disso, foram aplicados 300 kg ha^{-1} de superfosfato triplo. As leguminosas foram plantadas em 2011 e foram consorciadas com capim mulato (*Brachiaria hibrida cv. Mulato*) e milho (cv AG 7088). A adubação das culturas do milho e capim consistiu na aplicação de 400 kg ha^{-1} da formulação 04-20-20 + 7 kg de Zn ha^{-1} e adubações de cobertura, aos 15 e 40 dias após o plantio do milho com 40 kg ha^{-1} de N na forma de uréia e 36 kg ha^{-1} de K_2O na forma de cloreto de potássio. A área útil do experimento consiste nas aléias de acácia e leucena.

O manejo de podas foi iniciado após o estabelecimento das leguminosas. Foram feitas duas podas em 2013 e duas em 2014 (uma antes da semeadura e outra após a emergência do milho) com produção de massa seca total de 822 kg

ha⁻¹ por leucena e 3369 kg ha⁻¹ por acácia, em 2013, não foi feita a pesagem da massa seca em 2014. A taxa de sobrevivência das plantas após as podas foi de aproximadamente 90% para leucena e apenas 30% para acácia. Além da alta mortalidade, as árvores de acácia que rebrotaram encontravam-se subdesenvolvidas no campo.

2.2 Amostragem, isolamento e caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de acácia e leucena

A amostragem englobou as leguminosas arbóreas acácia e leucena. Foram amostradas 20 plantas de cada espécie, coletando-se 10 nódulos por planta. Cinco nódulos de cada espécie foram cortados ao meio para visualização da coloração interna, com objetivo de avaliar a presença de leg-hemoglobina. Os nódulos restantes foram lavados em água corrente, secos em papel toalha e acondicionados em frascos contendo algodão e sílica-gel para conservação.

Para o isolamento das estirpes bacterianas foram utilizados 22 nódulos de leucena e 44 de acácia. Maior quantidade de nódulos de acácia foi utilizada em virtude da presença de muitos nódulos, cujo isolamento não resultou na obtenção de estirpes. O isolamento e a caracterização fenotípica das estirpes foi realizado em meio 79 (FRED e WAKSMAN, 1928), também denominado YMA (VINCENT, 1970), com azul de bromotimol. O isolamento foi precedido de hidratação dos nódulos em água esterilizada por 30 minutos e desinfestação superficial com álcool (30 segundos), H₂O₂ (3 minutos) e água estéril (6 enxagues). Os nódulos foram macerados, com pinça estéril, em placas com meio 79 e incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias. As colônias foram repicadas até obtenção de cultura pura.

As características fenotípicas avaliadas foram: tempo de surgimento de colônias isoladas (rápido: 1-3 dias, intermediário: 4-5 dias, lento: 6-10 dias e muito lento: acima de 10 dias) e alteração do pH do meio 79 com indicador azul

de bromotimol (ácido, alcalino ou neutro). Com base na caracterização fenotípica, estirpes isoladas de nódulos de leucena (23 estirpes) e acácia (13 estirpes), representantes dos grupos fenotípicos observados, foram selecionadas para identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e autenticação.

2.3 Extração de DNA e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a extração de DNA as estirpes selecionadas de acordo com a caracterização fenotípica foram repicadas em placas de petri contendo meio 79 e incubadas a 28 °C de acordo com o tempo de surgimento de colônias isoladas para cada estirpe. Após comprovação da pureza, foi realizada extração de DNA pela metodologia de lise alcalina (NIEMANN et al., 1997).

A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada usando 5 µL DNA, 5 µL tampão 10X KCl, 4 µL MgCl₂ (2,5 mM), 5 µL dNTP Mix (2 mM), 1 µL de cada primer, 27F e 1492R a 10 mmol L⁻¹ (LANE, 1991), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U µL⁻¹) e água Mili-Q estéril, para reação com volume final de 50 µL. A reação foi desenvolvida em termociclador Eppendorf Mastercycler nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 segundos), anelamento (55 °C por 40 segundos), extensão (72 °C por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final de 72° por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (1%) com adição do corante SYBR Safe (Invitrogen) sob luz UV, juntamente com o marcador (1 Kb DNA Ladder), para verificar a qualidade das bandas e tamanho dos produtos amplificados. Os produtos de PCR foram enviados para o laboratório da Macrogen (Coreia), para purificação e sequenciamento. A qualidade das sequências obtidas foi verificada utilizando o software

Bionumerics 7.1 e comparadas ao banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information).

2.4 Autenticação e eficiência dos isolados

Estirpes selecionadas para identificação também foram autenticadas em plantas de sirato (*Macroptilium atropurpureum*), espécie escolhida por ser altamente promíscua, apresentar crescimento rápido e fácil condução em casa de vegetação. A escarificação, desinfestação superficial e pré-germinação das sementes de sirato foi realizada de acordo com Florentino et al. (2009).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em duas etapas. Foram testadas 18 estirpes na primeira etapa e 18 na segunda. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições. Os tratamentos foram: I – baixa concentração de N mineral ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$) e inoculado com 1 mL de células crescidas em meio 79 líquido, de cada estirpe analisada; II – dois controles positivos, inoculados com as estirpes UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium* sp.) com comprovada eficiência em sirato (FLORENTINO et al., 2009) e SEMIA 656 (*Bradyrhizobium* sp.), autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculante para sirato, pela Instrução Normativa nº 13 (BRASIL, 2011); III – controle não inoculado e com baixa concentração ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$) de N mineral, para verificar possível contaminação e IV- controle não inoculado, com alta concentração ($52,5 \text{ mg L}^{-1}$) de N mineral. A condução do experimento foi feita em garrafas tipo *long neck* contendo solução nutritiva de Hoagland estéril (HOAGLAND e ARNON, 1950) a $\frac{1}{4}$ de força.

O experimento foi conduzido durante 45 dias e ao final foi analisado o número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e eficiência relativa (ERCN), em relação ao tratamento com alta concentração de N mineral. A ERCN foi

calculada de acordo com a fórmula $ERCN (\%) = \frac{MSPA}{N} \times 100$ do tratamento inoculado com a estirpe/MSPA do tratamento com alta concentração de N x 100. Foi calculado ainda o coeficiente de correlação de Person (r) entre os parâmetros MSN e MSPA e NN e MSPA. Sessenta por cento das estirpes com nodulação positiva foram amostradas para reisolamento e comparação das características fenotípicas em relação ao inóculo. Para o reisolamento foram coletados e utilizados dois nódulos de cada tratamento (estirpe).

Para atender as premissas estatísticas os dados de siratro inoculado com estirpes de leucena MSPA e NN, na primeira etapa, e MSPA, MSR e MSN, na segunda etapa, foram transformados por $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$, para todas as estirpes. Essa mesma transformação foi utilizada para MSPA e R/PA para todas as estirpes isoladas de acácia e inoculadas em siratro, na segunda etapa do experimento. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa de análise estatística Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

Dados de matéria seca e número de nódulos que não apresentaram distribuição normal, mesmo após transformação, foram submetidos a análise estatística não paramétrica, utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2013). Para estes dados foi utilizado os teste de Kruskal-Wallis, para verificar a existência de diferença estatística significante entre os tratamentos e, posteriormente, pelo teste de Wilcoxon, foram feitas comparações pareadas das médias.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização fenotípica e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes de bactérias isoladas de nódulos de acácia e leucena

Foram observados três nódulos de acácia com coloração interna branca durante a avaliação visual em campo, todos os nódulos de leucena apresentaram coloração interna vermelha. Os isolamentos de bactérias de nódulos de acácia e leucena resultaram na obtenção de 19 e 41 estirpes, respectivamente. Especificamente em acácia foi observada grande quantidade de nódulos inativos e senescentes e o isolamento de muitos nódulos não resultou na obtenção de estirpes.

Com base nas características fenotípicas observou-se a existência de sete fenótipos distintos entre as estirpes isoladas de nódulos de acácia e apenas quatro entre as estirpes de leucena. Tanto para leucena quanto para acácia foi observada a predominância de estirpes de crescimento rápido. Crescimento intermediário e lento foi observado em estirpes de acácia. Não houve presença de estirpes de crescimento lento em leucena. A reação neutra foi predominante entre as estirpes oriundas de leucena, enquanto que nas de acácia houve maior quantidade de estirpes capazes de alcalinizar o meio (Figura 2). Todas as estirpes reisoladas apresentaram características fenotípicas idênticas as dos seus respectivos inóculos, isso demonstra que se tratavam do mesmo isolado.

A similaridade entre as estirpes estudadas e as do GenBank variou entre 94 e 100%. Entre as estirpes de leucena foram identificados rizóbios de dois gêneros, *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, sendo a maioria das estirpes (78%) pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*. Estirpes não nodulíferas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus* também foram encontradas colonizando os nódulos de leucena (Tabela 1). Em acácia foram identificados rizóbios dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e

Bradyrhizobium. A maioria das estirpes de acácia (38%) pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 4). Estirpes não nodulíferas também foram encontradas colonizando nódulos de acácia e pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Terriglobus*, *Paenibacillus* e *Kineococcus* (Tabela 4). Os gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* ocorreram em ambas as leguminosas, entretanto estirpes desse gênero foram mais presentes em nódulos de leucena.

3.2 Autenticação e eficiência das estirpes isoladas de leucena e acácia

O controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral não apresentou nodulação, indicando ausência de contaminação do experimento (Tabela 1). O controle com alta concentração de N mineral foi superior ($p < 0,05$) as estirpes oriundas de leucena e aos demais controles para todos os parâmetros de crescimento e eficiência relativa (Tabela 1). Todas as estirpes oriundas de leucena, mesmo as identificadas nos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, foram ineficientes em promover a fixação biológica de nitrogênio com siratro e apresentaram MSPA, MSR e ERCN similares ($p > 0,05$) ou inferiores ($p < 0,05$), no caso de UFLA01-925 e UFLA01-939, ao controle sem inoculação e com baixa concentração de N (Tabela 1). A relação raiz/parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes de leucena testadas foi similar ($p > 0,05$) a do controle sem inoculação e com baixa concentração de N e inferior ($p < 0,05$) nos controles inoculados e no controle com alta concentração de N (Tabela 1).

O número de nódulos, na segunda etapa do experimento, e a matéria seca de nódulos, na primeira etapa, para leucena, não apresentaram distribuição normal, mesmo após a transformação dos dados. Para estes parâmetros foi utilizada análise estatística não paramétrica. A maioria das estirpes isoladas de leucena produziu número de nódulos, em siratro, semelhante aos dos controles inoculados com SEMIA 656 e UFLA04-212. Entre as estirpes testadas na primeira etapa, apenas quatro, UFLA01-923, identificada como *Paenibacillus*

sp., e as estirpes de *Mesorhizobium* sp. UFLA01-931, UFLA01-936 e UFLA01-938, produziram número de nódulos inferiores ($p < 0,05$) aos dos controles inoculados (Tabela 1). Para as estirpes autenticadas na segunda etapa, foi verificada a existência de diferença significativa no número de nódulos pelo teste de Kruskal-Wallis ($H = 29,23$, $p = 0.002091$). A comparação de médias par a par pelo teste de Wilcoxon indicou que as estirpes UFLA01-919, UFLA01-925 e UFLA01-937, pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*, promoveram números de nódulos estatisticamente similares aos dos dois controles inoculados. Enquanto que UFLA01-929 e UFLA01-939 (*Mesorhizobium* sp.), produziram nódulos em quantidades similares ao controle inoculado com SEMIA 656 mas inferiores ($p < 0,081$) ao controle UFLA04-212 (Tabela 2).

Com relação a MSN de leucena, para as estirpes testadas na primeira etapa o teste de Kruskal-Wallis ($H = 32,65$, $p = 0.0005993$) revelou a existência de diferença estatística significativa na matéria seca de nódulos. A comparação par a par pelo teste de Wilcoxon indicou que os controles inoculados com SEMIA 656 e UFLA04-212 apresentaram matéria seca de nódulos superiores ($p < 0,064$ ou $p < 0,077$) aos de todas as estirpes testadas (UFLA01-914, 915, 921, 922, 923, 926, 927, 931, 933, 935, 936 e 938), pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Paenibacillus* e *Mesorhizobium* (Tabela 3). As estirpes inoculadas na segunda etapa (UFLA01- 916, 919, 920, 925, 928, 929, 937, 939, 924, 930 e 934), pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Bacillus* e *Staphylococcus*, produziram matéria seca de nódulos inferiores ($p < 0,05$) as dos dois controles inoculados (Tabela 1). Pode-se verificar que a matéria seca de nódulos nas plantas inoculadas com as estirpes de leucena apresentou médias inferiores aos dos controles inoculados, diferentemente do que ocorreu com o número de nódulos. Houve baixa correlação e correlação negativa ($r = 0,38282$ na primeira etapa e $r = -0,20225$ na segunda etapa) entre MSN e MSPA das plantas

inoculadas com estirpes de leucena. O mesmo ocorreu na relação entre NN e MSPA ($r=0,41062$ na primeira etapa e $r=-0,10369$ na segunda etapa).

Com relação ao experimento de siratro inoculado com estirpes isoladas de acácia, verificou-se que também não houve nodulação no controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral, indicando ausência de contaminação no experimento (Tabela 4). Entre as estirpes isoladas de acácia também foi observada baixa eficiência. O controle com alta concentração de N mineral foi superior ($p<0,05$) a todas as estirpes testadas, ao controle sem inoculação e com baixa concentração de N e aos dois controles inoculados (UFLA04-212 e SEMIA 656) para MSPA, MSR e ERCN (Tabela 4). Entre as estirpes testadas na primeira etapa, UFLA01-944, identificada como *Mesorhizobium sp.*, foi a que apresentou melhor resultado, igualando-se ($p>0,05$) a SEMIA 656 para MSPA e ERCN, entretanto, esta estirpe foi inferior ($p<0,05$) ao controle inoculado com UFLA04-212 e ao controle com alta concentração de N (Tabela 4). Na segunda etapa, as estirpes de *Bradyrhizobium sp.*, UFLA01-949 e UFLA01-953, apresentaram ERCN e MSPA superior ($p<0,05$) as estirpes UFLA01-940, 946, 947, 949, 952, 953 e UFLA01-956 mas foram inferiores ($p<0,05$) aos dois controles inoculados e ao controle com alta concentração de N. Com exceção das estirpes citadas, todas as estirpes isoladas de acácia tiveram desempenho similar ($p>0,05$) ao controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral para MSPA e ERCN (Tabela 4). O peso seco da raiz foi maior no controle com alta concentração de N nas duas etapas, todas as estirpes produziram efeitos similares ($p>0,05$) ao controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral para este parâmetro. A relação raiz/parte aérea foi maior ($p<0,05$) nos tratamentos onde a MSPA foi inferior (Tabela 4).

Para a matéria seca de nódulos e número de nódulos em siratro, inoculado com estirpes isoladas de acácia, foram aplicadas análises estatísticas

não paramétricas. O teste de Kruskal-Wallis indicou a presença de diferença estatística significativa para o número de nódulos em plantas de siratro tanto na primeira ($Z=25,38$; $p=0,002574$) quanto na segunda ($Z= 24,6$; $p= 0,001767$) etapa do experimento. Na primeira etapa, o teste de Wilcoxon revelou que plantas inoculadas com as estirpes UFLA01-944, UFLA01-955 e UFLA01-957, pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*, não apresentam diferença significativa entre si e nem entre os dois controles inoculados para o número de nódulos. UFLA01-942, UFLA01-943, pertencentes ao gênero *Bacillus* e UFLA01-950, *Terriglobus* sp., não nodularam (Tabela 5). Na segunda etapa, a comparação par a par, pelo teste de Wilcoxon, revelou que a estirpe UFLA01-949 (*Bradyrhizobium* sp.) produziu número de nódulos estatisticamente semelhante aos dois controles inoculados e UFLA01-953 teve media similar a SEMIA 656 mas diferiu ($p<0,081$) de UFLA04-212. As estirpes UFLA01-940 (*Rhizobium* sp.), UFLA01-946 (*Kineococcus* sp.) e UFLA01-947 (*Terriglobus* sp.) não nodularam (Tabela 6).

Para a variável matéria seca de nódulos, o teste de Kruskal-Wallis indicou presença de diferença estatística significativa para a primeira ($Z=27,55$; $p=0,001132$) e segunda ($Z=24,05$; $p=0,002244$) etapa. A MSN na primeira etapa apresentou comportamento semelhante ao NN. O teste de Wilcoxon indicou que as plantas de siratro inoculadas com as estirpes UFLA01-944, identificada como *Mesorhizobium* sp., UFLA01-955 e UFLA01-957, identificadas como *Bradyrhizobium*, não apresentaram diferença significativa entre si e apresentaram medias superiores ($p<0,064$ para 01-944 e $p<0,059$ para 01-955 e 01-957) as demais estirpes (Tabela 7). Pelo mesmo teste, UFLA01-944 (*Mesorhizobium* sp.) apresentou MSN estatisticamente semelhante aos dois controles inoculados, UFLA01-955 apresentou MSN inferior ($p<0,077$) aos dois controles inoculados e UFLA01-957 foi estatisticamente semelhante a SEMIA 656 mas inferior ($p<0,077$) a UFLA04-212 (Tabela 8). Para a segunda etapa, a

comparação par a par pelo teste de Wilcoxon indicou que o peso de nódulos das estirpes UFLA01-949 e UFLA01-953, ambas *Bradyrhizobium* sp., não apresentaram diferença significativa entre si e nem entre os controles inoculados. Estas estirpes apresentaram médias superiores ($p < 0,064$ para 01-949 e $p < 0,059$ para 01-953) as demais estirpes (Tabela 8). Entre as estirpes de acacia foi observada alta correlação ($r = 0,886131$ na primeira etapa e $r = 0,963818$ na segunda etapa) entre MSN e MSPA, já entre NN e MSPA essa correlação ($r = 0,745217$ na primeira etapa e $r = 0,765144$ na segunda etapa) foi bem menor. As estirpes identificadas nos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Kineococcus*, *Terriglobus* e *Staphylococcus* não promoveram nodulação em siratro.

4 DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fenotípica e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes de bactérias isoladas de nódulos de acácia e leucena

Foi obtida menor quantidade de estirpes do isolamento de nódulos de acácia, mesmo sendo utilizado o dobro do número de nódulos, ocorreu em virtude da existência de um grande número de nódulos senescentes ou inativos. A coloração branca no interior dos nódulos, observada durante a avaliação visual, indica ausência de leg-hemoglobina e, conseqüentemente, de fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A presença de muitos nódulos senescentes e inativos em acácia pode ser explicada pela condição das árvores em campo. Especificamente as plantas de acácia, não conseguiram se recuperar das podas periódicas a que foram submetidas no manejo do sistema de cultivo em aléias. As árvores encontravam-se subdesenvolvidas e apresentaram alta taxa de mortalidade na época da amostragem, superior a 70% (informação verbal)¹. A poda drástica das leguminosas, que neste estudo ocorreu cerca de quatro meses antes da amostragem, resulta em diminuição vertiginosa da FBN e perda de nódulos, tanto em número quanto em biomassa. A senescência dos nódulos após os cortes da leguminosa ocorre durante longos períodos de tempo, o que pode resultar em pouca mudança da biomassa líquida de nódulos por planta, principalmente se nódulos senescentes não forem liberados ou ocorrer atraso na formação de novos nódulos (FOWNES e ANDERSON, 1991; VANCE et al., 1979). Isso provavelmente ocorreu com as árvores de acácia do sistema estudado. A perda de nódulos adquire maior importância quando colabora para o atraso da recuperação da árvore após o corte, além de fornecer oportunidade para a

¹ Informação fornecida pela Prof. Dra. Alana das Chagas Ferreira Aguiar da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, co-ordenadora do projeto de sistema de cultivo em aléias amostrado.

infecção por estirpes de rizóbios ineficientes e outras bactérias endofíticas e/ou oportunistas (FOWNES e ANDERSON, 1991).

A predominância de crescimento rápido e reação neutra entre as estirpes isoladas de nódulos de leucena está relacionada com a identificação da maioria destas estirpes nos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*. Estes gêneros são descritos como bactérias de crescimento rápido ou intermediário, no caso de *Mesorhizobium*, e reação ácida ou neutra em meio 79 com azul de bromotimol (MOREIRA e SIQUERIA, 2006). A baixa diversidade fenotípica observada entre as estirpes de leucena está relacionada com a similaridade da característica fenotípica tempo de crescimento desses dois gêneros predominantes. Além disso, há presença de endofíticos que geralmente são de crescimento rápido (JARAMILLO et al., 2013). A ocorrência de nodulação de leucena com grupos de rizóbios de crescimento rápido foi relatada previamente (SANGINGA et al., 1995; WANG et al., 2006). *Mesorhizobium* e *Rhizobium* estão entre os gêneros capazes de nodular leucena em diversas regiões (DE LAJUDIE et al., 1998; MOREIRA et al., 1998; XU et al., 2013; WANG et al., 1999; WANG et al., 2006). Leucena é considerada uma hospedeira promíscua e pode ser nodulada por, no mínimo três gêneros de bactérias dentre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Cupriavidus* (DA SILVA et al., 2012; MOREIRA et al., 1998; WANG et al., 1999; WANG et al., 2006).

A grande porcentagem de *Bradyrhizobium* sp. entre as estirpes isoladas de acácia, explica a presença de crescimento lento e reação alcalina em meio 79, uma vez que estas são características marcantes do gênero (JORDAN, 1982). A presença de endofíticos e dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* determinou a presença de crescimento rápido entre as estirpes de acácia. Diversos trabalhos têm demonstrado ser comum a simbiose entre acácia e estirpes de *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 1993, 1998; PERRINEAU et al., 2011; TURK e KEYSER, 1992;). Le Roux et al. (2009) sugeriram que a nodulação de

acácia ocorre preferencialmente por *Bradyrhizobium elkanii*. Entretanto, os gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* também são encontrados nodulando acácia, em diferentes regiões (NGOM et al., 2004; NUSWANTARA et al., 1997; PERRINEAU et al., 2014; WANG et al., 2006). A predominância de estirpes de crescimento lento em leguminosas tropicais foi relatada há décadas (NORRIS, 1965).

Estirpes pertencentes a classe Firmibacteria, dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*, os mesmos encontrados neste estudo, tem sido isoladas de nódulos de leguminosas sem uma clara indicação de seu papel dentro do hospedeiro e são consideradas endofíticas (COSTA et al., 2013; DE MEYER et al., 2015; LI et al., 2008; MARRA et al., 2012). Estudos têm demonstrado que bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são capazes de coexistirem com estirpes simbióticas de *Bradyrhizobium* nos nódulos e até aumentar a nodulação de leguminosas com esse simbiote (HALVERSON e HANDELSMAN, 1991; LI et al., 2008; SRINIVASAN et al., 1996). Além disso, há relato de capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio em leguminosas por estirpes pertencentes a esse gênero (COSTA et al., 2013). O gênero *Terriglobus* foi descrito mais recentemente e pertence ao filo *Acidobacteria*. Estas bactérias são amplamente distribuídas no solo, entretanto existem poucas estirpes cultiváveis e sua ecologia e função ainda é pouco conhecida (EICHORST et al., 2007; MÄNNISTÖ et al., 2011; WHANG et al., 2014). Não existem relatos anteriores de isolamento deste gênero de nódulos de leguminosas. Sua presença nos nódulos de acácia é inédita e sugere capacidade de colonização endofítica de estirpes desse gênero. O gênero *Kineococcus* foi proposto recentemente e engloba bactérias aeróbias, gram positivas, móveis e com formato de coccus, neste gênero são encontrados habitantes do solo e endofíticos, como a estirpe encontrada em nódulos de acácia neste trabalho (BIAN et al., 2012; YOKOTA et al., 1993).

Tanto a caracterização fenotípica, quanto a identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelam que acácia e leucena são colonizadas por grupos de bactérias distintos, mesmo estando na mesma área de estudo, logo, a ocupação dos nódulos por estirpes de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Bradyrhizobium* foi determinada pelo hospedeiro. O fato de muitas estirpes de rizóbio serem capazes de nodular uma variedade de diferentes espécies de leguminosas também ocorre e explica a presença dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* nas duas leguminosas (MOREIRA et al., 1998).

4.2 Autenticação e eficiência das estirpes isoladas de leucena e acácia

Apesar da autenticação de estirpes de leucena e acácia ser comum no próprio hospedeiro (BALA e GILLER, 2006; LE ROUX et al., 2009; PERRINEAU et al., 2011, 2014; XU et al., 2013; WANG et al., 2003, 2006), o siratro foi escolhido por ser altamente promiscuo e apresentar capacidade de nodular com vários gêneros e espécies de rizóbios, além de produzir sementes com longa viabilidade disponíveis o ano inteiro, o que não ocorre com acácia, o ciclo mais curto de siratro também é vantajoso em experimentos em casa de vegetação (JESUS et al., 2005; LIMA et al., 2009). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* são gêneros conhecidamente nodulíferos de leguminosas, várias estirpes desses gêneros têm sido isoladas ou autenticadas utilizando o siratro como planta isca. Entretanto, siratro não nodulou com as estirpes UFLA01-936 (*Mesorhizobium* sp.) e UFLA01-940 (*Rhizobium* sp.) o que indica possível especificidade destas estirpes com as leguminosas hospedeiras das quais foram isoladas, neste caso leucena para UFLA01-936 e acácia para UFLA01-940. De acordo com estes resultados pode-se inferir que, apesar de considerada promiscua, siratro apresenta certa limitação para autenticação visto não ter sido totalmente eficiente na nodulação com todas as estirpes de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Ausência de nodulação em siratro inoculado com

estirpes oriundas de leguminosas arbóreas também foi relatada por Bala e Giller (2001). A ausência de nodulação com as estirpes endofíticas não é incomum a medida que relatos de nodulação por estes gêneros são escassos.

A nodulação positiva, embora comprove a condição simbiótica das estirpes, não garante a eficiência destas em fixar nitrogênio e promover o desenvolvimento do hospedeiro. Apesar da inoculação com a maioria das estirpes de rizóbios oriundas de leucena ter produzido número de nódulos semelhantes aos dos controles inoculados em siratro, isso não resultou em uma alta fixação de nitrogênio. A matéria seca dos nódulos, com médias inferiores as obtidas com os controles inoculados com UFLA04-212 e SEMIA 656, refletiu diretamente na baixa eficiência observada por essas estirpes. Diferentemente do que ocorreu com leucena, as estirpes de acácia que apresentaram parâmetros de crescimento superiores aos do controle com baixa concentração de nitrogênio foram as que proporcionaram maior nodulação tanto em número quanto em matéria seca. Matéria seca de nódulos e rendimento de *A. mangium* apresentaram correlação linear, já o número de nódulos teve baixa correlação com o rendimento dessa planta, para leucena tanto a MSN quanto o NN apresentaram baixa correlação com o rendimento da planta. A correlação entre número de nódulos e produção de matéria seca nem sempre é direta mas alta correlação entre matéria seca de nódulos e rendimento da planta foi observado anteriormente em acácia (SUN et al., 1992). O comportamento da relação R/PA foi similar tanto em leucena quanto em acácia, ou seja, relação R/PA inferior onde a MSPA e ERCN foi superior.

A maior MSR no controle com alta concentração de nitrogênio é reflexo do maior desenvolvimento das plantas em virtude da disponibilidade adequada do nitrogênio. As inoculações com estirpes oriundas de leucena e acácia, que foram ineficientes em fixar nitrogênio, e o controle sem inoculação e com baixa concentração de nitrogênio mineral, proporcionaram menor disponibilidade de

nitrogênio para as plantas razão pela qual a relação raiz/parte aérea foi maior nestes tratamentos. Esse desbalanço entre desenvolvimento radicular e o crescimento da parte aérea é explicado tanto pela limitação do desenvolvimento vegetativo imposta pela carência de nitrogênio, quanto pelo aumento da matéria seca das raízes, que consiste numa resposta morfológica da planta a ausência deste nutriente (SILVA e DELATORRE, 2009).

Neste estudo, todas as estirpes isoladas de leucena, inclusive os rizóbios, foram ineficientes em fixar nitrogênio em simbiose com siratro. Apesar de algumas estirpes de *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* terem se destacado em relação ao controle com baixa concentração de N, a inoculação das estirpes oriundas de acácia em plantas de siratro também resultou em baixa ERCN, MSPA e MSR. Em geral, rizóbios tropicais são constituídos por subgrupos de variada eficácia e especificidade simbiótica (GUIMARÃES et al., 2015; LIMA et al., 2009; MARRA et al., 2012; THIES et al., 1991). Além disso, a eficiência do processo de fixação biológica de N₂ depende de fatores da planta, da bactéria, do clima e do solo. A avaliação da eficiência de estirpes indígenas é importante, mesmo quando não são encontradas estirpes eficientes, à medida que serve como base para predizer a necessidade de inoculação (TURK e KEYSER, 1992). Deve-se atentar para o fato que a nodulação em siratro permite autenticar várias estirpes como nodulíferas, entretanto, a baixa eficiência encontrada nas relações das estirpes com siratro não podem ser extrapoladas para sua relação com os hospedeiros de origem, que devem ser investigadas em trabalho posterior.

5 CONCLUSÕES

Acácia e leucena estabelecem simbiose com rizóbios fenotípica e geneticamente diferentes, com predomínio do gênero *Mesorhizobium* em leucena e *Bradyrhizobium* em acácia.

Bactérias não simbióticas dos gêneros *Bacillus*, *Terriglobus*, *Paenibacillus* e *Kineococcus* foram encontradas colonizando nódulos de acácia, enquanto que os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus* estão presentes em nódulos de leucena.

Este é o primeiro relato da capacidade endofítica de estirpes do gênero *Terriglobus*.

Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, apresentam nodulação em plantas de siratro. Entretanto as estirpes indígenas da Pré-Amazônia maranhense apresentaram baixa eficiência.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C.F.; AMORIM, A. P.; COELHO, K. P.; MOURA, E. G. Environment and agricultural benefits of a management system designed for sandy loam soils of the humid tropics. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1473–1480, 2009.
- AGUIAR, A. D. C. F.; DE FREITAS, I. C.; CARVALHO, C. S.; MARQUES MONROE, P. H.; DE MOURA, E. G. Efficiency of an agrosystem designed for family farming in the pre-Amazon region. **Renewable Agriculture and Food Systems**, v. 26, n. 01, p. 24-30, 2010.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 76, n. 2-3, p. 319-330, 2006.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 495-507, 2001.
- BIAN, G. K.; FENG, Z. Z.; QIN, S.; et al. *Kineococcus endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal halophyte in Jiangsu, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 4, p. 621-628, 2012.
- BRASIL. Instrução normativa n. 13 de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília n. 58, 25 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>>. Acesso em 28 abr. 2016.
- CHRISTENSEN, B. T. **Organic matter in soil-structure, function and turnover**. 2000. Tese de Doutorado. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Center Foulum, 2000.
- COELHO, K. P. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de gliricídia, leucena e sombreiro no Maranhão**. 2010. 67 f..Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.9, p. 1275-1284, 2013.

DA SILVA, K.; DE SOUZA CASSETARI, A.; LIMA, A. S.; DE BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 4, p. 253-262, 2012.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; DREYFUS, B. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 2, p. 369-382, 1998.

DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 1-11, 2015.

EICHORST, S. A.; BREZNAK, J. A.; SCHMIDT, T. M. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2708-2717, 2007.

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

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 667-676, 2009.

FOWNES, J. H.; ANDERSON, D. G. Changes in nodule and root biomass of *Sesbania sesban* and *Leucaena leucocephala* following coppicing. **Plant and Soil**, v. 138, n. 1, p. 9-16, 1991.

FRED, E. B.; WASKMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; DE FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; ALMEIDA, K. A.; LEBBE, L.; SILVA, K. B.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A., et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 6726-6733, 2012.

HALVERSON, L. J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2767-2770, 1991.

HOAGLAND, D. R.; ARNOLD, D. T. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 6, p. 397-404, 2013.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; DE OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 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**, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E, Goodfellow M (ed), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991, pp 115-148.

LE ROUX, C.; TENTCHEV, D.; PRIN, Y.; GOH, D.; JAPARUDIN, Y.; PERRINEAU, M. M.; GALIANA, A. *Bradyrhizobia* nodulating the *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* interspecific hybrid are specific and differ from

those associated with both parental species. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7752-7759, 2009.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; DA SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1-2, p. 127-145, 2009.

MÄNNISTÖ, M. K.; RAWAT, S.; STAROVOYTOV, V.; HÄGGBLÖM, M. *M. Terriglobus saanensis* sp. nov., an acidobacterium isolated from tundra soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1823-1828, 2011.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; DE OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L., DE FRÁGUAS CARVALHO, R.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and soil**, v. 357, n. 1-2, p. 289-307, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 135-146: 1993.

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

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

MOURA, E. G.; SENA, V. G. L.; CORREA, M. S.; AGUIAR, A. C. F. The Importance of an Alternative for Sustainability of Agriculture around the Periphery of the Amazon Rainforest. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 5, p. 70-78, 2013.

NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H. V.; SIMON, R.; SELBITSHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Mycrobiology**, v. 82, p. 477-484, 1997.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v. 22, n. 2, p. 143-166, 1965.

NUSWANTARA, S.; FUJIE, M.; SUKIMAN, H. I.; YAMASHITA, M.; YAMADA, T.; MUROOKA, Y. Phylogeny of bacterial symbionts of the leguminous tree *Acacia mangium*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 511-518, 1997.

PERRINEAU, M. M.; LE ROUX, C.; DE FARIA, S. M.; DE CARVALHO BALIEIRO, F.; GALIANA, A.; PRIN, Y.; BÉNA, G. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 5, p. 376-384, 2011.

PERRINEAU, M. M.; LE ROUX, C.; GALIANA, A.; FAYE, A.; DUPONNOIS, R.; GOH, D.; BÉNA, G. Differing courses of genetic evolution of *Bradyrhizobium* inoculants as revealed by long-term molecular tracing in *Acacia mangium* plantations. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5709-5716, 2014.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for estatistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2013. <http://www.R-project.org/>. Acessado em 01 de Setembro de 2015.

SANGINGA, N.; VANLAUWE, B.; DANSO, S. K. A. Management of biological N₂ fixation in alley cropping system: estimation and contribution to N balan;ce. **Plant and Soil**, v. 174, p.119–141, 1995.

SILVA JUNIOR, E. M. **Eficiência de rizóbios para feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em áreas de agricultura familiar na Pré-Amazônia**

maranhense. 2009. 48 f.. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) -, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009.

SILVA, A. A.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 152-163, 2009.

SRINIVASAN, M.; PETERSON, D. J.; HALL, F. B. Influence of indolacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1006-1014, 1996.

SUN, J. S.; SANDS, R.; SIMPSON, R. J. Genotypic variation in growth and nodulation by seedlings of Acacia species. **Forest Ecology and Management**, v. 55, n. 1, p. 209-223, 1992.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Sub-groups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1540-1545, 1991.

TURK, D.; KEYSER, H. H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of microbiology**, v. 38, n. 6, p. 451-460, 1992.

VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H.; BARNES, D. K.; BRYAN, J. W.; JOHNSON, L. E. Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. **Plant Physiology**, v. 64, p. 1-8, 1979.

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

WANG, E. T.; KAN, F. L.; TAN, Z. Y.; TOLEDO, I.; CHEN, W. X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diverse *Mesorhizobium plurifarium* populations native to Mexican soils. **Archives of microbiology**, v. 180, n. 6, p. 444-454, 2003.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 5, p. 711-724, 1999.

WANG, F. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. F.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 6, p. 502-517, 2006.

WHANG, K. S.; LEE, J. C.; LEE, H. R.; HAN, S. I.; CHUNG, S. H. *Terriglobus tenax* sp. nov., an exopolysaccharide-producing acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 431-437, 2014.

XU, K. W.; PENTTINEN, P.; CHEN, Y. X.; CHEN, Q.; ZHANG, X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013.

YOKOTA, A.; TAMURA, T.; NISHII, T.; HASEGAWA, T. *Kineococcus aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic, gram-positive, motile coccus with meso-diaminopimelic acid and arabinogalactan in the cell wall. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 1, p. 52-57, 1993.

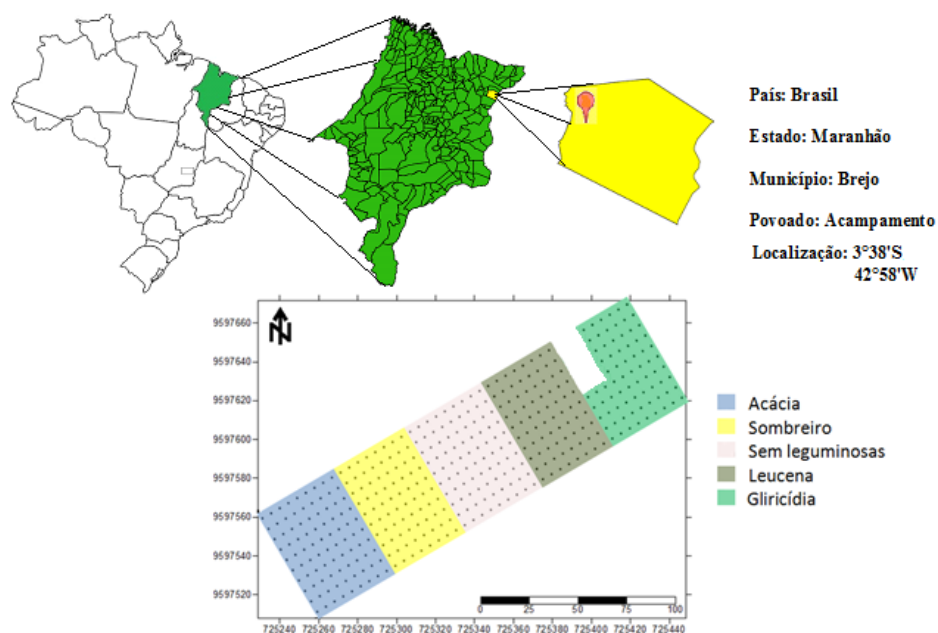


Figura 1. Localização e croqui da área experimental amostrada. As diferentes cores indicam as leguminosas quem compõe o sistema de aléias. Em todas as parcelas as leguminosas arbóreas são consorciadas com milho e capim mulato, na parcela sem leguminosa apenas o milho e o capim são cultivados. Para este estudo foram amostradas apenas as leguminosas leucena e acácia. Os pontos pretos são georreferenciados e indicam pontos onde são coletadas amostras de solo.

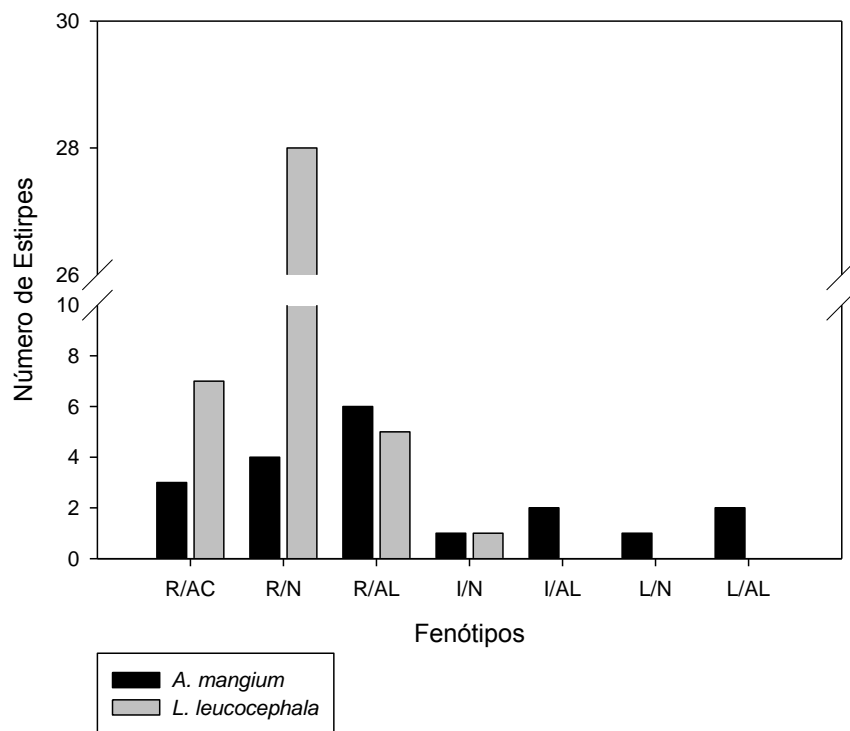


Figura 2. Distribuição das estirpes isoladas de nódulos de *Acacia mangium* e *Leucaena leucocephala*, cultivadas em um sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense, de acordo com os grupos fenótipos obtidos. As características fenotípicas observadas foram: tempo de surgimento de colônias isoladas (R - rápido: 1 a 3 dias; I - intermediário: 4 a 5 dias; L - lento: 6 a 10 dias); e reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol (AC-ácido; N-neutro; AL-alcálico).

Tabela 1 - Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e parâmetros de crescimento, eficiência e nodulação em *Macropitilium atropurpureum* inoculado com estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Leucaena leucocephala* coletados em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

ETAPA 1													
Código UFLA	Nod ¹	Caract. Culturais ²	Extensão (pb) 16S rRNA	Sequência mais similar encontrada no GenBank			MSPA ³g/planta.....	MSR	R/PA	ERCN	MSN ⁵ mg/planta	NN ³ N°/planta	
				Espécies	N° de Acesso	Similaridade (%)							
52,5 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,65a ⁴	0,33a	0,51b	100a	0	0b	
5,25 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,11d	0,13b	1,10a	18d	0	0b	
C. UFLA04-212	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,27b	0,19b	0,69b	41b	59	29a	
C. SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,21c	0,11b	0,51b	33c	40	30a	
UFLA01-914	+	R/AL	1302	<i>Rhizobium</i> sp.	KF113106.2	99	0,084d	0,108b	1,26a	13d	3	11a	
UFLA01-915	+	R/AL	933*	<i>Rhizobium</i> sp.	GU433459.1	99	0,092d	0,100b	1,08a	14d	3	12a	
UFLA01-921	+	R/N	1297	<i>Mesorhizobium</i> sp.	EU584257.1	99	0,082d	0,106b	1,33a	13d	5	13a	
UFLA01-922	+	R/N	1927	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	100	0,082d	0,098b	1,17a	13d	2	10a	
UFLA01-923	-	R/AC	1311	<i>Paenibacillus</i> sp.	AY745242.1	99	0,064d	0,114b	1,78a	10d	0	0b	
UFLA01-926	+	R/N	1308	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99	0,074d	0,113b	1,62a	11d	2	10a	
UFLA01-927	+	R/AL	1275	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99	0,085d	0,111b	1,33a	13d	10	17a	
UFLA01-931	+	R/N	1268	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99	0,079d	0,123b	1,64a	12d	1	5b	
UFLA01-933	+	R/N	1288	<i>Mesorhizobium</i> sp.	KJ128393.1	99	0,087d	0,107b	1,22a	13d	3	10a	
UFLA01-935	+	R/N	835*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	KM253153.1	97	0,072d	0,076b	0,96a	11d	3	11a	
UFLA01-936	-	R/N	1267	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	100	0,061d	0,069b	1,09a	9d	0	0b	
UFLA01-938	+	R/N	1190	<i>Mesorhizobium</i> sp.	EU584257.1	100	0,064d	0,073b	1,00a	10d	0	4b	

¹(+) presença e (-) ausência de nódulos em *M. atropurpureum*. ²Características culturais em meio 79 sólido: tempo de surgimento de colônias isoladas: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (6-10 dias); ML-muito lento (acima de 10 dias). Reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcálico. *utilizada apenas a sequência forward. 52,5 mg/l = controle com alta concentração de nitrogênio mineral e sem inoculação; 5,25 mg/l = controle com baixa concentração de N mineral e sem inoculação; Controles C. UFLA04-212 e C. SEMIA 656: inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. MSPA-Matéria Seca da Parte Aérea; MSR- Matéria Seca da Raiz. R/PA-Razão Raiz Parte Aérea; ERCN-Eficiência Relativa ao controle com alta concentração de N mineral; MSN-Matéria Seca de Nódulos; NN-n° de nódulos. ³Dados transformados por $\sqrt{X + \sqrt{X+1}}$. ⁴Médias com letras iguais, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo de acordo com o teste de Scott-Knott a 5%. ⁵Utilizada análise estatística não paramétrica, resultados em outra tabela

Tabela 1. Continuação

ETAPA 2												
Código UFLA	Nod ¹	Caract. Culturais ²	Extensão (pb) 16S rRNA	Sequência mais similar encontrada no GenBank			MSPA ³	MSR ³	R/PA	ERCN	MSN ³	NN ⁵
				Espécies	Nº de Acesso	Similaridade (%)						
52,5 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	1,357a ⁴	0,576a	0,43b	100a	0d	0
5,25 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,109c	0,125c	1,13a	8c	0d	0
C. UFLA04-212	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,43b	0,234b	0,55b	32b	44a	36
C. SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,374b	0,148c	0,39b	28b	48a	32
UFLA01-916	-	R/N	1341	<i>Bacillus</i> sp.	JX173281.1	100	0,101c	0,127c	1,26a	7c	0d	0
UFLA01-919	+	R/AL	1296	<i>Mesorhizobium</i> sp	AB636289.1	99	0,108c	0,129c	1,23a	8c	7b	49
UFLA01-920	+	R/N	1267	<i>Mesorhizobium</i> sp	AB636289.1	100	0,103c	0,113c	1,11a	8c	1c	6
UFLA01-925	+	R/N	1304	<i>Mesorhizobium</i> sp	JN085508.1	99	0,062d	0,081c	1,28a	5c	2b	23
UFLA01-928	+	R/N	662 [*]	<i>Mesorhizobium</i> sp	JN191654.1	100	0,105c	0,104c	1,00a	8c	1c	7
UFLA01-929	+	R/N	1208	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AY875974.1	99	0,101c	0,117c	1,16a	7c	2b	15
UFLA01-937	+	R/N	1232	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99	0,087c	0,116c	1,33a	6c	4b	38
UFLA01-939	+	R/N	972 [*]	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	100	0,067d	0,088c	1,36a	5c	3b	14
UFLA01-924	+	R/N	1299	<i>Mesorhizobium</i> sp	KJ128393.1	99	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
UFLA01-930	Nd	R/N	1400	<i>Staphylococcus</i> sp.	JQ082131.1	99	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
UFLA01-934	+	R/N	1270	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AY875974.1	100	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

¹(+) presença e (-) ausência de nódulos em *M. atropurpureum*. ²Características culturais em meio 79 sólido: tempo de surgimento de colônias isoladas: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (6-10 dias); ML-muito lento (acima de 10 dias). Reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcálico. ³utilizada apenas a sequência forward. 52,5 mg/l = controle com alta concentração de nitrogênio mineral e sem inoculação; 5,25 mg/l = controle com baixa concentração de N mineral e sem inoculação; Controles C. UFLA04-212 e C. SEMIA 656: inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. MSPA-Matéria Seca da Parte Aérea; MSR- Matéria Seca da Raiz. R/PA-Razão Raiz Parte Aérea; ERCN-Eficiência Relativa ao controle com alta concentração de N mineral; MSN-Matéria Seca de Nódulos; NN-nº de nódulos. ³Dados transformados por $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$. ⁴Médias com letras iguais, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo de acordo com o teste de Skott-Knott a 5%. ⁵Utilizada análise estatística não paramétrica, resultados em outra tabela.

Tabela 2 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de *M. artropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Leucaena leucocephala* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da 2ª etapa (Experimento conduzido em duas etapas).

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA01- 916 (\bar{x} =0)	UFLA 01-919 (\bar{x} =49)	UFLA 01-920 (\bar{x} =6)	UFLA 01-925 (\bar{x} =23)	UFLA 01-928 (\bar{x} =7)	UFLA 01-929 (\bar{x} =15)	UFLA 1-937 (\bar{x} =38)	UFLA 01-939 (\bar{x} =14)	Com N (\bar{x} =0)	C. SEMIA 656 (\bar{x} =32)	Baixo N (\bar{x} =0)
UFLA01-919 (\bar{x} =49)	0,064*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-920 (\bar{x} =6)	ns	0,081	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-925 (\bar{x} =23)	0,064	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-928 (\bar{x} =7)	ns	0,081	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-929 (\bar{x} =15)	0,064	0,081	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-
UFLA01-937 (\bar{x} =38)	0,064	ns	0,081	ns	0,081	0,081	-	-	-	-	-
UFLA01-939 (\bar{x} =14)	0,064	ns	ns	ns	ns	ns	0,081	-	-	-	-
Com N (\bar{x} =0)	ns	0,064	ns	0,064	ns	0,064	0,064	0,064	-	-	-
C. SEMIA 656 (\bar{x} =32)	0,064	ns	0,081	ns	0,081	ns	ns	ns	0,064	-	-
Baixo N (\bar{x} =0)	ns	0,064	ns	0,064	ns	0,064	0,064	0,064	ns	0,064	-
C. UFLA04-212 (\bar{x} =36)	0,064	ns	0,081	ns	0,081	0,081	ns	0,081	0,064	ns	0,064

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral (52,5 mg/l) e sem inoculação; Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; C.UFLA 04-212 e C.SEMIA 656: controles com baixa concentração de N mineral e inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} =média do número de nódulos/planta.

Tabela 3 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de *M. atropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Leucaena leucocephala* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da 1º etapa de um experimento conduzido em duas etapas.

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA 01-914 (\bar{x} =3)	UFLA 01-915 (\bar{x} =3)	UFLA 01-921 (\bar{x} =5)	UFLA 01-922 (\bar{x} =2)	UFLA 01-923 (\bar{x} =0)	UFLA 01-926 (\bar{x} =2)	UFLA 01-927 (\bar{x} =10)	UFLA 01-931 (\bar{x} =1)	UFLA 01-933 (\bar{x} =3)	UFLA 01-935 (\bar{x} =3)	UFLA 01-936 (\bar{x} =0)	UFLA 01-938 (\bar{x} =0)	Com N (\bar{x} =0)	C. SEMIA 656 (\bar{x} =40)	Baixo N (\bar{x} =0)
UFLA01-915 (\bar{x} =3)	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-921 (\bar{x} =5)	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-922 (\bar{x} =2)	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-923 (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-926 (\bar{x} =2)	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-927 (\bar{x} =10)	ns	0,047*	ns	0,047	0,047	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-931(\bar{x} =1)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-933 (\bar{x} =3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-935 (\bar{x} =3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-
UFLA01-936 (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	-	-	-	-	-
UFLA01-938 (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	-	-	-	-	-
Com N (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	-	-	-	-	-
C. SEMIA 656 (\bar{x} =40)	0,077	0,064	0,077	0,064	0,064	0,077	0,064	0,064	0,064	0,077	0,064	0,064	0,064	-	-
Baixo N (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,064	-
C. UFLA04-212 (\bar{x} =59)	0,077	0,064	0,077	0,064	0,064	0,077	0,064	0,064	0,064	0,077	0,064	0,064	0,064	ns	0,064

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral (52,5 mg/l); Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; C.UFLA04-212 e C.SEMIA 656: controles inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} =média do peso de nódulos em mg/planta.

Tabela 4 - Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e parâmetros de crescimento, eficiência e nodulação em *Macropitium atropurpureum* de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Acacia mangium* coletados em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

Código UFLA	Nod ¹	Caract. Culturais ²	Extensão (pb) 16S rRNA	ETAPA 1								
				Sequência mais similar encontrada no GenBank			MSPA	MSR	R/PA	ERCN	MSN ⁵	NN ⁵
				Espécies	Nº de Acesso	Similaridade (%)g/planta.....	%	mg/planta	Nº/planta		
52,5 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,65a ⁴	0,33a	0,51c	100a	0	0
5,25 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,11d	0,13b	1,10b	18d	0	0
C. UFLA04-212	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,27b	0,19b	0,69c	41b	59	29
C. SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,21c	0,11b	0,51c	33c	40	30
UFLA01-942	-	R/AL	795*	<i>Bacillus</i> sp.	JQ316240.1	99	0,07d	0,12b	1,71a	12d	0	0
UFLA01-943	-	R/N	1326	<i>Bacillus</i> sp.	KC596006.1	100	0,09d	0,12b	1,29b	14d	0	0
UFLA01-944	+	R/AL	1342	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	94	0,17c	0,11b	0,65c	26c	31	33
UFLA01-950	-	R/N	977*	<i>Terriglobus</i> sp.	AY587228.1	99	0,08d	0,10b	1,26b	13d	0	0
UFLA01-955	+	L/AL	768*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FR872439.1	100	0,1d	0,10b	1,13b	14d	15	30
UFLA01-957	+	L/AL	613*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100	0,14d	0,09b	0,65c	22d	33	23

Tabela 4. conclusão

ETAPA 2												
Código UFLA	Nod ¹	Caract. Culturais ²	Extensão (pb) 16S rRNA	Sequência mais similar encontrada no GenBank			MSPA ³g/planta.....	MSR	R/PA ³	ERCN	MSN ⁵ mg/planta	NN ⁵ N°/planta
				Espécies	N° de Acesso	Similaridade (%)						
52,5 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	1,36a4	0,58a	0,43c	100a	0	0
5,25 mg de N L ⁻¹	---	---	---	---	---	---	0,11d	0,12c	1,13b	8d	0	0
C. UFLA04-212	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,43b	0,23b	0,54c	32b	44	36
C. SEMIA 656	+	L/AL	---	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	---	---	0,37b	0,15c	0,39c	28b	48	32
UFLA01-940	-	R/AL	1274	<i>Rhizobium</i> sp.	KF922663.1	100	0,09d	0,14c	1,59a	7d	0	0
UFLA01-946	-	R/N	1168	<i>Kineococcus</i> sp.	FJ214365.1	99	0,10d	0,10c	1,03b	7d	0	0
UFLA01-947	-	R/AC	1286	<i>Terriglobus</i> sp.	AY587229.1	99	0,11d	0,12c	1,11b	8d	0	0
UFLA01-949	+	I/AL	419 [*]	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100	0,30c	0,12c	0,39c	22c	39	34
UFLA01-953	+	I/AL	924 [*]	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100	0,32c	0,11c	0,35c	23c	37	16
UFLA01-952	-	R/AC	1345	<i>Paenibacillus</i> sp.	EF612325.1	99	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
UFLA01-956	+	L/AL	1250	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KC677617.1	100	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

¹(+) presença e (-) ausência de nódulos em *M. atropurpureum*. ²Características culturais em meio 79 sólido: tempo de surgimento de colônias isoladas: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (6-10 dias); ML-muito lento (acima de 10 dias). Reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcalino. ^{*}utilizada apenas a sequência forward. 52,5 mg/l = controle com alta concentração de nitrogênio mineral e sem inoculação; 5,25 mg/l = controle com baixa concentração de N mineral e sem inoculação; Controles C. UFLA04-212 e C. SEMIA 656: inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. MSPA-Matéria Seca da Parte Aérea; MSR- Matéria Seca da Raíz. R/PA-Razão Raíz Parte Aérea; ERCN-Eficiência Relativa ao controle com alta concentração de N mineral; MSN-Matéria Seca de Nódulos; NN-n° de nódulos. ³Dados transformados por $\sqrt{X} + \sqrt{X+1}$. ⁴Médias com letras iguais, na mesma coluna, pertencem ao mesmo grupo de acordo com o teste de Skott-Knott a 5%. ⁵Utilizada análise estatística não paramétrica, resultados em outra tabela. Nd-não determinado.

Tabela 5 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de *M. atropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Acacia mangium* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da primeira etapa de um experimento conduzido em duas etapas.

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA 01-942 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-943 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-944 ($\bar{x}=44$)	UFLA 01-950 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-955 ($\bar{x}=30$)	UFLA 01-957 ($\bar{x}=33$)	Com N ($\bar{x}=0$)	C. SEMIA 656 ($\bar{x}=30$)	Baixo N ($\bar{x}=0$)
UFLA01-943 ($\bar{x}=0$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-944 ($\bar{x}=33$)	0,059*	0,059	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-950 ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,059	-	-	-	-	-	-
UFLA01-955 ($\bar{x}=30$)	0,064	0,064	ns	0,064	-	-	-	-	-
UFLA01-957 ($\bar{x}=33$)	0,064	0,064	ns	0,064	ns	-	-	-	-
Com N ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,059	ns	0,064	0,064	-	-	-
C. SEMIA 656 ($\bar{x}=30$)	0,064	0,064	ns	0,064	ns	ns	0,064	-	-
Baixo N ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,059	ns	0,064	0,064	ns	0,064	-
C.UFLA04-212 ($\bar{x}=29$)	0,064	0,064	ns	0,064	ns	ns	0,064	ns	0,064

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral (52,5 mg/ l) sem inoculação; Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; C. UFLA04-212 e C. SEMIA 656: controles inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} = media de número de nódulos/planta.

Tabela 6 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para número de nódulos por planta de *M. atropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Acacia mangium* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da segunda etapa de um experimento conduzido em duas etapas.

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA 01- 940 (\bar{x} =0)	UFLA 01-946 (\bar{x} =0)	UFLA 01-947 (\bar{x} =0)	UFLA 01-949 (\bar{x} =34)	UFLA 01-953 (\bar{x} =16)	Com N (\bar{x} =0)	C. SEMIA 656 (\bar{x} =32)	Baixo N (\bar{x} =0)
UFLA01-946 (\bar{x} =0)	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-947 (\bar{x} =0)	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-949 (\bar{x} =34)	0,064*	0,064	0,064	-	-	-	-	-
UFLA01-953 (\bar{x} =16)	0,064	0,064	0,064	0,081	-	-	-	-
Com N (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	0,064	0,064	-	-	-
C. SEMIA 656 (\bar{x} =32)	0,064	0,064	0,064	ns	ns	0,064	-	-
Baixo N (\bar{x} =0)	ns	ns	ns	0,064	0,064	ns	0,064	-
C. UFLA04-212 (\bar{x} =36)	0,064	0,064	0,064	ns	0,081	0,064	ns	0,064

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral (52,5 mg/l) e sem inoculação; Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; C. UFLA04-212 e C. SEMIA 656: controles inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} = média de número de nódulos/planta.

Tabela 7 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de *M. artropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Acacia mangium* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da primeira etapa de um experimento conduzido em duas etapas.

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA 01- 942 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01- 943 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01- 944 ($\bar{x}=31$)	UFLA 01- 950 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01- 955 ($\bar{x}=15$)	UFLA 01- 957 ($\bar{x}=33$)	Com N ($\bar{x}=0$)	C. SEMIA 656 ($\bar{x}=40$)	Baixo N ($\bar{x}=0$)
UFLA01-943 ($\bar{x}=0$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-944 ($\bar{x}=31$)	0,064*	0,064	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-950 ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,064	-	-	-	-	-	-
UFLA01-955 ($\bar{x}=15$)	0,059	0,059	ns	0,059	-	-	-	-	-
UFLA01-957 ($\bar{x}=33$)	0,059	0,059	ns	0,059	ns	-	-	-	-
Com N ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,064	ns	0,059	0,059	-	-	-
SEMIA 656 ($\bar{x}=40$)	0,064	0,064	ns	0,064	0,077	ns	0,064	-	-
Baixo N ($\bar{x}=0$)	ns	ns	0,064	ns	0,059	0,059	ns	0,064	-
C. UFLA04-212 ($\bar{x}=59$)	0,064	0,064	ns	0,064	0,077	0,077	0,064	ns	0,064

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral e sem inoculação (52,5 mg/l); Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; C.UFLA04-212 e C.SEMIA 656: controles inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. atropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} = média do peso de nódulos em mg/planta.

Tabela 8 - Comparação par a par por Wilcoxon rank sum test para peso de nódulos por planta de *M. artropurpureum* inoculada com estirpes indígenas isoladas de *Acacia mangium* em sistema de cultivo em aléias na pré-Amazônia maranhense. Resultados da segunda etapa de um experimento conduzido em duas etapas.

CONTROLE/ ESTIRPE	UFLA 01-940 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-946 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-947 ($\bar{x}=0$)	UFLA 01-949 ($\bar{x}=39$)	UFLA 01-953 ($\bar{x}=37$)	Com N ($\bar{x}=0$)	C. SEMIA 656 ($\bar{x}=48$)	Baixo N ($\bar{x}=0$)
UFLA01-946 ($\bar{x}=0$)	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-947 ($\bar{x}=0$)	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA01-949 ($\bar{x}=39$)	0,064	0,064	0,064	-	-	-	-	-
UFLA01-953 ($\bar{x}=37$)	0,059	0,059	0,059	ns	-	-	-	-
Com N ($\bar{x}=0$)	ns	ns	ns	0,064	0,059	-	-	-
C. SEMIA 656 ($\bar{x}=48$)	0,059	0,059	0,059	ns	ns	0,059	-	-
C. Absoluto ($\bar{x}=0$)	ns	ns	ns	0,064	0,059	ns	0,059	-
C. UFLA04-212 ($\bar{x}=44$)	0,059	0,059	0,059	ns	ns	0,059	ns	0,059

Com N: controle com alta concentração de nitrogênio mineral (52,5 mg/l) e sem inoculação; Baixo N: controle com baixa concentração de N mineral (5,25 mg/l) e sem inoculação; UFLA 04-212 e SEMIA 656: controles inoculados com estirpes de comprovada eficiência em *M. artropurpureum*. ns- não significativo; *P value. \bar{x} = media do peso de nódulos em mg/planta.