



BRUNA DANIELA ORTIZ LOPEZ

**GENETIC AND SYMBIOTIC CHARACTERIZATION OF
NITROGEN-FIXING BACTERIA FROM THREE FOREST
LEGUMES**

**LAVRAS – MG
2018**

BRUNA DANIELA ORTIZ LOPEZ

**GENETIC AND SYMBIOTIC CHARACTERIZATION OF NITROGEN-FIXING
BACTERIA FROM THREE FOREST LEGUMES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dra. Amanda Azarias Guimarães

Coorientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Lopez, Bruna Daniela Ortiz.

Genetic and symbiotic characterization of nitrogen-fixing
bacteria from three forest legumes / Bruna Daniela Ortiz Lopez. -
2018.

42 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientador(a): Amanda Azarias Guimarães.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Leguminosas florestais.
3. Caracterização e identificação molecular. I. Moreira, Fatima
Maria de Souza. II. Guimarães, Amanda Azarias. III. Título.

BRUNA DANIELA ORTIZ LOPEZ

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM TRÊS LEGUMINOSAS FLORESTAIS**

**GENETIC AND SYMBIOTIC CHARACTERIZATION OF NITROGEN-FIXING
BACTERIA FROM THREE FOREST LEGUMES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, área de concentração Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em: 19 de Março de 2018.

Dr. Ederson Jesus da Conceição

Embrapa Agrobiologia/ UFRRJ

Dr. Teotonio Soares de Carvalho

UFLA

Prof. Dr. Lucas Amaral de Melo

UFLA

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

LAVRAS – MG

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão a todas as pessoas que fizeram parte de toda minha jornada, e quando digo jornada digo daqueles que foram responsáveis por me tornar cada dia melhor e que me acompanharam ao longo da minha vida inteira, me ajudando a construir e desconstruir tudo o que me tornei.

Um agradecimento especial aos meus pais, Margarita e Assis, que lutaram e continuam lutando para que eu nunca perca oportunidades de aprender cada dia mais e conseguir alcançar todos os meus sonhos. Vocês foram, são e serão sempre fundamentais em toda minha caminhada, tenho muita sorte em ser sua filha.

Ao meu irmão, Diego, que sempre me apoiou e me incentiva a cada passo que eu dou. Você é um grande exemplo que eu tenho o privilégio de ter comigo desde que nasci.

Aos meus amigos, os de longe e de perto, que me ajudam a superar todos os obstáculos que a vida vai colocando em nossa vida, seja com conversas, com conhecimento, na resolução de problemas, no ombro pra chorar ou nas confraternizações para relaxar. Com vocês tudo fica mais leve!

A minha Orientadora, professora Fatima Maria de Souza Moreira, a quem sempre admirei e quem se dedicou a mim com muito respeito, cuidado e atenção mesmo com a sua vida atarefada. Muito obrigada pelos ensinamentos.

A minha Coorientadora e amiga Amanda Azarias Guimarães, uma pessoa extremamente profissional e dedicada, que teve uma paciência enorme comigo e que me corrigiu sempre com muito carinho. Aprendi muito com você.

A minhas colegas de grupo de pesquisa Anita, Marcela, Barbara e Mariana, que me aturaram e ajudaram em tudo que precisei. Meninas: serei eternamente grata a tudo que fizeram por mim, não só em relação ao mestrado mas também em relação à vida.

À banca examinadora: Teotonio, Ederson e Lucas por aceitar participar da minha defesa e colaborar com a melhoria de todo meu trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência do Solo, seja técnicos (especialmente a Marlene que me aturou por esses dois anos com muita serenidade), funcionários da limpeza (em especial a Denise que sempre nos cativou com seu sorriso) e aos administrativos, em especial a Dirce que tem uma enorme paciência com nossa vida corrida e nossas dúvidas constantes.

Ao corpo docente do Departamento de Ciência do Solo, composto por professores que contribuíram com minha formação de maneira exemplar.

Às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelas bolsas, recursos e apoio concedido.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A degradação do meio ambiente é um problema global que está intimamente ligado ao mau uso dos recursos naturais, o qual promove desequilíbrio das condições necessárias para recuperação natural. Desta forma é preciso que haja intervenção humana na recuperação dessas áreas. O uso da fixação biológica de nitrogênio pode melhorar a qualidade dos projetos de recuperação de áreas degradadas, favorecendo a disponibilidade do nitrogênio atmosférico para mudas florestais tornando-os mais sustentáveis e menos onerosos além de gerarem benefícios diversos em relação ao melhor estabelecimento das mudas no campo. Para isso é necessário identificar estirpes específicas para cada espécie vegetal e com eficiência comprovada. Com essa finalidade foi realizado um estudo de identificação de estirpes isoladas de nódulos presentes em mudas florestais nativas da região sudeste do Brasil, das espécies *Machaerium nycitans*, *Platypodium elegans* e *Ormosia arborea*, que seriam utilizadas para recuperação de áreas. A identificação das mesmas foi feita pelo sequenciamento dos genes *housekeeping* (*atpD* e *gyrB*) e comparação filogenética com sequências do gene 16S rRNA, além disso, foram realizadas a autenticação destas estirpes nas espécies florestais de origem e a amplificação do gene simbiótico *nifH*. Nos experimentos de autenticação foi avaliada a capacidade de nodulação e outros parâmetros morfofisiológicos (massa seca das plantas, número de nódulos, massa seca de nódulos, teor de nitrogênio e quantidade total de N na parte aérea e índice SPAD) das plantas para verificar a eficiência simbiótica. A análise filogenética dos genes *housekeeping* mostrou presença de novos cinco novos clados formados pelas estirpes estudadas, identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (3), *Bradyrhizobium* (2), os quais possuem alta probabilidade de serem espécies ainda não descritas. Dentre as 21 estirpes estudadas, 17 apresentaram capacidade nodulífera e em 12 dessas foi possível amplificar o gene simbiótico *nifH*. Dentre os parâmetros morfofisiológicos avaliados o índice SPAD permite detectar diferença na eficiência simbiótica entre os tratamentos, que não foi observado avaliando a massa seca da parte aérea, correlacionando os valores de nitrogênio total das plantas.

Palavras-chave: 16S rRNA. *housekeeping genes*. *nifH*. Autenticação. Eficiência simbiótica.

ABSTRACT

Environmental degradation is a global problem that is closely linked to nature resource misuse, which promotes imbalance of the conditions necessary for natural recovery. In this way it is necessary that there is human intervention in the recovery of these areas. The use of biological nitrogen fixation can improve the quality of recovery projects in degraded areas, favoring the availability of atmospheric nitrogen for forest seedlings, making them more sustainable and less costly, besides generating different benefits in relation to the best establishment of the seedlings in the field. For this it is necessary to identify specific strains for each plant species and with proven efficiency. For this purpose, a study was carried out to identify strains isolated from nodules present in forest seedlings native to the southeastern region of Brazil, *Machaerium nyctitans*, *Platypodium elegans* and *Ormosia arborea*, which would be used to recover areas. The identification of the same was done by sequencing the housekeeping genes (*atpD* and *gyrB*) and phylogenetic comparison with sequences of the 16S rRNA gene, in addition, the authentication of these strains in the native forest species and the amplification of the symbiotic *nifH* gene were performed. In the authentication experiments the nodulation capacity and other morphophysiological parameters (dry mass of the plants, number of nodules, dry mass of nodules, nitrogen content and total amount of N in shoot and SPAD index) of the plants were evaluated to verify the efficiency symbiotic relationship. The phylogenetic analysis of the housekeeping genes showed the presence of new five new clades from the studied strains identified as belonging to the genera *Rhizobium* (3), *Bradyrhizobium* (2), which have a high probability of being species not yet described. Among the 21 strains studied, 17 had nodule capacity and in 12 of these it was possible to amplify the symbiotic *nifH* gene. Among the morphophysiological parameters evaluated, the SPAD index allows to detect a difference in the symbiotic efficiency among the treatments, which was not observed by evaluating the dry mass of the aerial part, correlating the total nitrogen values of the plants.

Keywords: 16S rRNA. housekeeping genes. *nifH*. Authentication. Symbiotic efficiency.

SUMÁRIO

PRIMERA PARTE.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. Ambientes degradados.....	11
2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	13
2.3. Uso de espécies FBN na produção de mudas florestais.....	14
2.4. Identificação de estirpes de BFNNL	15
REFERÊNCIAS	17
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	19
ARTIGO – GENETIC AND SYMBIOTIC CHARACTERIZATION OF NITROGEN-FIXING BACTERIA FROM THREE FOREST LEGUMES	19

PRIMERIA PARTE

1. INTRODUÇÃO

O solo é um sistema heterogêneo, descontínuo, complexo e dinâmico, dotado de condições variadas para promover o equilíbrio dos ecossistemas. Quanto maior a complexidade do habitat, maior a estabilidade, ou seja, quanto maior a biodiversidade do ambiente, maior será a capacidade de resiliência do sistema, devido à redundância funcional dos organismos nele presente. No entanto, pode ocorrer desequilíbrio tanto natural quanto antrópico, podendo gerar degradação ambiental.

A degradação de áreas ocorre quando são alteradas as características originais de um determinado ambiente tornando-o incapaz de se recuperar por conta própria, ou seja, quando é causado um impacto nos principais processos vitais que garantem a qualidade do solo, sendo esta qualidade determinada pela capacidade do solo em conseguir sustentar a boa produtividade biológica, mantendo o ambiente saudável bem como a própria saúde da fauna e da flora (DORAN & PARKIN, 1994).

Para a manutenção do equilíbrio ambiental, é necessário que seja restituído ao ambiente suas características originais. Entre essas características destaca-se o aporte de material orgânico do solo, que corresponde à fonte primária de energia dos organismos heterotróficos. No entanto, esse aporte está relacionado, principalmente, à produção de resíduos da biomassa vegetal, que em solo degradado fica limitada, devido à ausência ou baixos teores de nutrientes. Um dos principais nutrientes limitantes nestes solos é o nitrogênio, podendo ser perdido por lixiviação e/ou volatilização. A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2) pode ser uma alternativa econômica e sustentável para reverter o déficit deste nutriente, promover o crescimento vegetal e assim recuperar áreas.

As bactérias fixadoras de N_2 ou diazotróficas são procariotos que apresentam a capacidade de reduzir o N_2 atmosférico à amônia por meio da quebra da tripla ligação do N_2 pela ação da enzima nitrogenase. Dentro deste grupo existe um subgrupo de bactérias fixadoras de N_2 que estabelecem simbiose com leguminosas, as quais formam hipertrofia especializada nas raízes das plantas chamada de nódulos. Nessa relação simbiótica o processo ocorre de maneira mais eficiente da que ocorre com bactérias associativas, por não haver interferência do oxigênio na nitrogenase, a qual interfere na sua atividade. Além

disso, a simbiose promove a formação de amônia dentro do nódulo garantindo que esta não seja perdida para o ambiente, como ocorre com adubação convencional (mineral).

Vários estudos têm sido feitos com relação à simbiose desse tipo de bactérias com leguminosas, como a que ocorre na soja (*Glycine max*), e alguns em espécies de leguminosas florestais. A utilização dessa biotecnologia de inoculação de organismos diazotróficos em espécies leguminosas florestais nativas seria uma alternativa sustentável para uso em projetos de revegetação e restauração ambiental. No entanto, apesar de já haver estirpes aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) para diferentes espécies florestais, o uso é escasso e ainda existem simbioses desconhecidas. *Machaerium nycitans*, *Ormosia arborea* e *Platypodium elegans* são exemplos de espécies florestais nodulíferas, que ainda não possuem estirpes recomendadas e são importantes para restauração de áreas degradadas (LORENZI, 1992; ALVARENGA, 2006).

Recentemente, Costa, 2014 verificou a formação de nódulos em raízes de mudas destas três espécies arbórea, os isolados foram devidamente identificados e autenticados (nodulação positiva) em uma espécie vegetal considerada promíscua como é o caso de *Macropitium atropurpureum* (Siratro), ou seja, que apresenta capacidade de estabelecer simbiose com rizóbio de diferentes gêneros. Desse modo, o objetivo deste trabalho é verificar quais isolados microbianos foram responsáveis pela nodulação de maneira mais eficiente, a fim de obter estirpes com potencial para serem inoculados nas espécies florestais de origem e produzir mudas de melhor qualidade em viveiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Ambientes degradados

Segundo o decreto Federal 97.632/89, a degradação ambiental ocorre pelo processo que resulta em danos ao meio ambiente, reduzindo ou extinguindo propriedades que garantem a capacidade produtiva e sua qualidade (BRASIL, 1989). Pode ocorrer tanto natural quanto antrópicamente. Isto é, a partir do impacto permanente causado por mau uso dos recursos naturais, eis que o ambiente fica impedido de retomar seu estado natural por conta própria. Assim como a perda da capacidade resiliente do ambiente, é perdida a capacidade produtiva, de modo que a qualidade do solo em questão se torna inferior e há

perda da riqueza biológica natural, sendo necessária intervenção humana para a recuperação do mesmo (BOTELHO, 2007).

A degradação pode ocorrer com a perturbação do ambiente a partir da remoção da vegetação que, em consequência, causa diminuição da fauna. Além dos organismos macroscópicos ocorre uma perturbação a nível microscópico, ou seja, bactérias fungos e demais organismos presentes no solo podem sofrer com atividades como mineração, mau manejo de áreas agricultáveis (monocultura, pesticidas, fertilizantes, mecanização, etc.), extração de recursos naturais principalmente para abastecimento do setor industrial, desmatamento e atividade madeireira, turismo irresponsável, dentre outras. Essas atividades dentre outras estão presentes na resolução 01/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1986) como causadoras de impacto ambiental. Por estes motivos faz-se necessária a recuperação de áreas perturbadas ou degradadas para a manutenção da sobrevivência humana. Além de necessária, a recuperação de áreas degradadas é obrigatória, segundo Novo Código Florestal Brasileiro, pela Lei no 12.651, também conhecida como Lei de Proteção da Vegetação Nativa, a qual ressalta a obrigatoriedade do proprietário de terras em preservar o meio ambiente natural, mantendo áreas de preservação permanente (APPs) e Reserva Legal (RL) protegidos (BRASIL, 2012).

Após uma grande perturbação como corte de madeira, atividade de mineração ou queimadas, a floresta pode passar por processos sucessionais naturais ou artificiais (floresta plantada), formando uma floresta secundária. Se o processo sucessional for feito sem intervenção humana, entorno de 25 anos depois é possível atingir a estrutura florestal da floresta antiga (primária), porém só em densidade, a composição de espécies pode ser perdida em mais de 60% (ZANINI et. al., 2014). A perda de biodiversidade deve ser evitada, pois à medida que estinguem-se espécies do ecossistema diminui-se a redundância funcional que está intimamente ligada à resiliência do sistema, consequentemente o ambiente perde a capacidade de se restaurar (Moreira and Siqueira, 2006). Uma alternativa a este entrave pode ser a implantação de espécies nativas com as mais diversas características, como espécies com desenvolvimento rápido (*Machaerium nycitans*), ou consideradas pioneiras (*Platypodium elegans*), as quais podem acelerar o processo de revegetação, ou até espécies com capacidade germinativa impedida como é o caso da *Ormosia arborea* que podem ser importantes alvos de estudo visando evitar sua

extinção (LORENZI, 1992). Essas espécies citadas são encontradas em diversas áreas da região Sudeste e é muito importante a escolha dessas espécies para projetos de revegetação regionais, pois o estabelecimento das mesmas acaba sendo melhor por já estarem familiarizadas com as condições ambientais locais. No entanto, estudos com número maior de espécies devem ser encorajados além dos métodos de implantação e condução de projetos de recuperação (ZAHAWI, 2005), como, por exemplo, no uso de tecnologias como a fixação biológica de nitrogênio buscando melhorar a capacidade de restauração do ambiente em menor tempo possível.

2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio

Ao processo natural que ocorre pela ruptura da tripla ligação do N_2 atmosférico e transformação do mesmo na molécula orgânica NH_3 (amônia) pela ação de microrganismos chama-se fixação biológica de nitrogênio. Este processo só é possível devido à presença da enzima nitrogenase nos microrganismos denominados diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Ele é de extrema importância devido à necessidade deste nutriente para as plantas, sendo este seu maior limitante (VITOUSEK & FARRINGTON, 2016). No entanto o aumento do consumo e a necessidade de aumentar a produção agrícola têm provocado aumento na utilização de fertilizantes nitrogenados minerais, os quais são onerosos e poluentes devido à sua produção ser realizada pela queima de altas quantidades de combustíveis fósseis para atingir alta temperatura e pressão (processo de Haber-Bosh) além de poderem causar poluição do ar, lençóis freáticos e cursos d'água. Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA, 2015) a utilização de fertilizantes nitrogenados tem dobrado a cada 10 anos, o que pode prejudicar o meio ambiente através da emissão de gases do efeito estufa (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; PIATTO ET. AL. 2015), contaminação de mananciais e destruição da camada de ozônio a partir do óxido nítrico (GROFFMAN, 2000). Este entrave torna-se o principal motivo para a utilização do processo de FBN através do desenvolvimento de biotecnologias e conseguir diminuir os problemas decorrentes do uso desenfreado de adubos minerais. A utilização da FBN como biotecnologia pode ser feita pela inoculação de estirpes bacterianas com capacidade fixadora de nitrogênio específicas para cada espécie vegetal. Estas bactérias podem ser de vida livre, associativas ou nodulíferas. Estes organismos são caracterizados, dentre outros, pelo mecanismo de

proteção da nitrogenase, sendo a nodulação o mecanismo que possui maior nível de evolução e, portanto, maior eficiência no processo de simbiose.

O processo de nodulação ocorre, inicialmente, com deficiência de nitrogênio disponível para as plantas (estresse), promovendo a liberação de substâncias conhecidas como flavonoides (sinalizadores moleculares) na região rizosférica, capazes de sinalizar às bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (rizóbios), a necessidade de realização de simbiose. A partir disso ocorre a infecção das bactérias na raiz (principalmente em pêlos radiculares), iniciando a formação do nódulo nas raízes ou, menos comumente, no caule. O nódulo é a estrutura onde os rizóbios ficam alojados e onde há proteção da enzima nitrogenase a qual degrada na presença de oxigênio. Grande parte dos procariontos responsáveis pela FBN é aeróbia, de modo que não sobreviveriam nas condições que a enzima necessita. No entanto, graças ao desenvolvimento da leg-hemoglobina, foi possível o transporte de oxigênio suficiente para a sobrevivência dos organismos dentro do nódulo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). No caso de haver fornecimento de nitrogênio mineral no solo, a fixação biológica de nitrogênio será inviabilizada, conforme elucidado por (BOAKYE, 2015).

2.3. Uso de espécies FBN na produção de mudas florestais

Estudos sugerem que o uso de cepas específicas de bactérias fixadoras de N₂ para cada espécie florestal específica pode, além de melhorar a fertilidade do solo, favorecer a reabilitação de áreas degradadas melhorando a qualidade do solo (KERMAH, 2017; MALIKI, 2016). BORGES et. al. (2016) relatam o uso de leguminosas noduladas na recuperação de locais com rejeito de mineração de bauxita, mostrando resultados positivos no estabelecimento dessas mudas, já que o aumento no fornecimento de nitrogênio pela fixação biológica de nitrogênio favoreceu a produção de biomassa vegetal, promovendo o crescimento de diversos outros organismos e, conseqüentemente, melhorando a biodiversidade. Interações benéficas entre organismos diazotróficos e leguminosas florestais podem ser encontrados na literatura, como na *Leucaena leucocephala* (PEREYRA, 2015), *Erythrina velutina* (MENEZES, 2017) *Stryphnodendron adstringens* e *Sclerolobium paniculatum* (FRANCO, 1995) dentre outras.

Para a implantação de projetos de recuperação recomenda-se o uso de alta diversidade de espécies, de preferência nativas. Se essas espécies tiverem capacidade nodulativa e tiverem estirpes eficientes identificadas de fixadores de N₂ o processo de produção de mudas e de estabelecimento da mesma no campo será favorecida (BORGES, 2016; ZAHARAN, 2017). As espécies *Ormosia arbórea*, *Machaerium nycitans* e *Platypodium elegans* possuem registros de nodulação (BARBERI, 1998; MOREIRA, 2016; WURZBURGER, 2016), no entanto ainda não há estirpe recomendada pelo MAPA, o que reafirma a necessidade de estudos com elas.

2.4. Identificação de estirpes de BFNNL

A identificação de estirpes capazes de nodular as espécies de interesse de maneira eficiente pode ser feita pelo isolamento de organismos presentes em nódulos previamente encontrados. Após o isolamento, caracterização e atribuição de um código de estirpe, devem ser aplicadas testes de autenticidade para cada isolado a fim de selecionar aqueles que, de fato, são os responsáveis pela nodulação da planta. Em pose de estirpes autênticas realiza-se a identificação molecular das mesmas a partir do sequenciamento de genes encontrados em regiões específicas da bactéria.

A identificação em nível de gênero pode ser facilmente feita pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, que, por ser uma região muito conservada do gene bacteriano, funciona como cronômetro molecular (WEISBURG, 1991). Já para a identificação em nível de espécie, é necessário o sequenciamento de regiões não tão conservadas quanto o gene 16S rRNA porém que estejam presentes em todos os procariotos com a finalidade de poder comparar espécies e averiguar as similaridades. É o caso do sequenciamento dos genes *housekeeping*s, os quais são responsáveis pelo funcionamento da célula bacteriana (MOREIRA, 2006). Se não for possível identificar a partir desses genes, no mínimo é possível detectar estirpes que podem ainda não terem sido descritas com bastante precisão, de modo que limita o número de estirpes que precisarão ser submetidas a análises mais complexas e onerosas para serem identificadas, como, por exemplo, no sequenciamento do genoma inteiro da bactéria.

Essa identificação de BFNNL para cada espécie de leguminosa é de extrema importância devido à especificidade dos organismos que participam da simbiose. A eficiência no processo de FBN pode ser maximizada se esta característica for estudada

com detalhes e, além disso, forem selecionadas estirpes cada vez mais resistentes às adversidades (clima, deficiências nutricionais, deficiências hídricas, competição, poluentes, etc), as quais podem beneficiar o estabelecimento de plantas em locais pouco convencionais.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. P.; BOTELHO, S. A.; PEREIRA, I. M. Avaliação da regeneração natural na recomposição de matas ciliares em nascentes na região sul de Minas Gerais. *Cerne*, Lavras, v. 12, n. 4, p. 360-372, out./dez. 2006.
- ANDA – Associação Nacional para Difusão de Fertilizantes, 2015. Disponível em: <http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por> Acessado em 20/01/2017.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*, v. 4, p. 145-153, 1998.
- BOAYKE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; OWUSU-BENNOAH, E.; DANSO, S. K. A. Growth and nodulation response of six indigenous trees and two shrubby legumes to phosphorus and nitrogen fertilizers in two soils of Ghana. *Journal of Tropical Agriculture*, v. 53, n. 1, p. 21-34, 2015.
- BORGES, W. L.; PRIN, Y.; DUCOUSSO, M.; LE ROUX, C.; FARIA, S. M. Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 314-321, 2016.
- BRASIL. Decreto n. 97.632 – 10 abr. 1989. Dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, inciso VIII, da Lei n. 6.938, de 31 de agosto de 1981 e dá outras providências.
- BRASIL. Lei nº 12.651 – 25 mai. 2012. Lei da proteção da vegetação nativa.
- CONAMA. Resolução nº 001, de 23 de janeiro de 1986. Publicado no D. O. U. de 17 de fevereiro de 1986.
- DORAN, J. W. & PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEZ, D. F. & STEWART, B. A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, SSSA, p. 1-20, 1994.
- FERREIRA, W. C.; BOTELHO, A. S.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Avaliação do crescimento do estrato arbóreo de área degradada revegetada à margem do Rio Grande, na usina hidrelétrica de Camargos, MG. *Revista Árvore*, v. 31, n. 1, p. 177-185, 2007.
- FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: Um modelo tecnológico. *Oecologia Brasilienses*, Rio de Janeiro (UFRJ), p. 459-467, 1995.
- GROFFMAN, P. M.; BRUMME, R.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DOBBIE, K. E.; MOSIER, A. R.; OJIMA, D.; PAPEN, H.; PARTON, W. J.; SMITH, K. A.; WAGNER-RIDDLE, C. Evaluating annual nitrous oxide fluxes at the ecosystem scale. *Global Biogeochemical Cycles*, v. 14, p. 1061-1070, dec. 2000.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352 p.
- MALIKI, R.; SINSIN, B.; FLOQUET, A.; CORNET, D.; MALEZIEUX, E.; VERNIER, P. Dry matter production, nutrient cycled and removed, and soil fertility

changes in Yam-Based cropping systems with herbaceous legumes in the Guinea – Sudan zone of Benin. *Scientifica*, Cairo. 2016.

MAPA. Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011.

MENEZES, K. A. S.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Genetic variability and symbiotic efficiency of *Erythrina velutina* Willd. root nodule bacteria from the semi-arid region in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 14, p. 1-13, 2017.

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

MOREIRA, F. M. S.; COELHO, K. P.; RIBEIRO, P. R. A.; GUIMARÃES, A. A. Nursey growth and rhizobia symbiosis of scandent Leguminosae species native to the Amazon region. *Acta Amazonica*, v. 46, n. 4, p. 367-376, 2016.

PEREYRA, G.; HARTMANN, H.; MICHALZIK, B.; ZIEGLER, W.; TRUMBORE, S. Influence of rhizobia inoculation on biomass gain and tissue nitrogen content of *Leucaena leucocephala* seedlings under drought. *Forest*, v. 6, n. 10, p. 3686-3703, 2015.

PIATTO, M.; COSTA, C. J.; PINTO, L. F. G. *Análise das emissões de GEE do setor agropecuário e o impacto das políticas públicas nas mudanças climáticas*, São Paulo, 2015.

VITOUSECK, P. M.; FARRINGTON, H. Nutrient limitation and soil: experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry*, v. 37, p. 63-75, apr. 1997.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WURZBURGER, N. & HEDIN, L. O. Corrigendum for Wurzbürger and Hedin. *Ecology letters*, v. 19, n. 5, p. 587-590, 2016.

ZAHAWI, R. A. Establishment and growth of living fence species: An overlooked tool for the restoration of degraded areas in the tropics. *Restoration Ecology*, v. 13, p. 92-102, mar. 2005.

ZANINI, K. J. et al. Atlantic rain forest recovery: successional drivers of floristic and structural patterns of secondary forest in Southern Brazil. *Journal of Vegetation Science*, v. 25, n. 4, p. 1056-1068, 2014.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO**ARTIGO – GENETIC AND SYMBIOTIC CHARACTERIZATION OF
NITROGEN-FIXING BACTERIA FROM THREE FOREST LEGUMES****NORMAS DA REVISTA APPLIED SOIL ECOLOGY**

Bruna Daniela Ortiz Lopez¹, Anita Fernanda dos Santos Teixeira¹, Daniele Cabral Michel¹, Marcela de Souza Pereira¹, Bárbara Luyse Marques Duarte¹, Amanda Azarias Guimarães¹, Fatima Maria de Souza Moreira¹

¹ Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Soil Science Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais – Brazil

*Corresponding author. Phone: +55 35 38291254. E-mail address: fmoreira@dcs.ufla.br (F. M. S. Moreira).

Resumo

A identificação de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) para espécies de leguminosas florestais nativas pode favorecer a produção de mudas para projetos de revegetação no campo. No entanto, há poucos estudos com a identificação de BFN para cada espécie devido à dificuldade de obtenção de sementes, germinação das mesmas, tempo, entre outros. Para isto foi realizada a identificação de estirpes bacterianas isoladas de *Machaerium nycitans*, *Platypodium elegans* e *Ormosia arborea*, através do sequenciamento dos genes *housekeeping* (*atpD* e *gyrB*) e comparação filogenética com sequências do gene 16S rRNA. Além disso, foram realizadas a autenticação destas estirpes nas espécies florestais de origem e a amplificação do gene simbiótico *nifH*. Nos experimentos de autenticação foi avaliada a capacidade de nodulação e outros parâmetros morfofisiológicos (massa seca das plantas, número de nódulos, massa seca de nódulos, teor de nitrogênio e quantidade total de N na parte aérea e índice SPAD) das plantas para verificar a eficiência simbiótica. A análise filogenética dos genes *housekeeping* mostrou presença de cinco novos clados formados pelas estirpes estudadas, identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (3) e *Bradyrhizobium* (2), os quais possuem alta probabilidade de serem espécies ainda não descritas. Dentre as 21 estirpes estudadas, 17 apresentaram capacidade nodulífera e em 12 dessas foi possível amplificar o gene simbiótico *nifH*. Dentre as variáveis morfofisiológicas avaliadas, o índice SPAD permite detectar diferença na eficiência simbiótica entre os tratamentos antes da massa seca da parte aérea, o qual se correlacionou com os valores de nitrogênio total das plantas.

Palavras-chave: 16S rRNA, *housekeeping* genes, *nifH*, autenticação, eficiência simbiótica

1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um excelente processo aliado à fertilidade do solo devido à sua conversão de nitrogênio atmosférico em amônia para as plantas, de maneira econômica e sustentável. A FBN mais eficiente é a que ocorre entre bactérias nodulíferas, também conhecidas como rizóbios, e plantas da família Fabaceae (Leguminosae) (REMIGI, 2016). As leguminosas são conhecidas pela sua alta demanda de nitrogênio, possuindo alto teor deste em sua massa seca total e, conseqüentemente, menor relação carbono/nitrogênio. Por isso, os resíduos vegetais de plantas desta família são mais facilmente decompostos, aumentando a ciclagem de nutrientes que irá contribuir

para melhorar a qualidade do solo (KERMAH, 2017; MALIKI, 2016). Esta característica faz com que o uso de espécies desta família para fins de revegetação e recuperação de áreas degradadas seja amplamente indicado. Além de reduzir os custos com adubação nitrogenada, promovem o acúmulo de biomassa em menor tempo, que favorece o reestabelecimento dos ciclos biogeoquímicos necessários à qualidade do solo. Os rizóbios são importantes aliados nesse processo de recuperação por estabelecerem simbioses eficientes com leguminosas e possibilitarem melhor estabelecimento de mudas em locais afetados por estresses (Borges et al., 2016; Zahran, 2017). *Machaerium nycitans*, *Platypodium elegans* e *Ormosia arborea* são espécies florestais nativas da região sudeste do Brasil e para uso em reflorestamento há preferencialidade no uso das espécies com tais características, as quais já possuem maior adaptabilidade e aumentam as chances de restauração da vegetação perdida. Essas espécies são fonte de matéria prima para marcenaria e são muito utilizadas em paisagismo e arborização urbana. Além disso, possuem sementes ortodoxas e de fácil obtenção, ou seja, podem ser armazenadas por longos períodos de tempo e, apesar de terem alguns relatos de nodulação com rizóbios, ainda não possuem estirpes recomendadas como inoculantes.

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar estirpes isoladas de nódulos de leguminosas florestais a partir do sequenciamento dos genes *housekeeping* (*atpD* e *gyrB*) e compará-los filogeneticamente com a identificação obtida pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, além de autenticar em casa de vegetação essas estirpes inoculadas em plântulas da espécie de origem, avaliando possíveis benefícios morfofisiológicos nas mudas e analisar a presença do gene específico para fixação de nitrogênio (*nifH*), com a finalidade de obter isolados com potencial biotecnológico de recomendação como inoculante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das estirpes

As estirpes utilizadas neste estudo foram isoladas de nódulos retirados de mudas florestais das espécies *Machaerium nycitans*, *Platypodium elegans* e *Ormosia arborea*, produzidas no viveiro do Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF/Miguelão, na Zona Rural do município de Nova Lima/MG, localizado na Fazenda Rio do Peixe S/N, e no viveiro pertencente à Mina de Córrego do Meio, no município de Sabará/MG, ambos

pertencentes à empresa Vale S. A. Após o isolamento e caracterização cultural em meio de cultura sólido 79, foram identificadas ao nível de gênero pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (tabela 1) (Costa, 2014).

2.2 Amplificação de sequenciamento de genes *housekeeping* (*atpD* e *gyrB*)

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo a recomendação do fabricante. A verificação da qualidade do DNA extraído foi feita utilizando NanoDrop. Após a extração foi realizada a amplificação dos genes *atpD* e *gyrB*. O mix preparado para a reação de PCR foi: Tampão 4 μ L; MgCl₂ 1,2 μ L (0,2 mM); dNTP 0,8 μ L (0,2 mM); iniciador 1 μ L (Tabela 1); DNA 4 μ L; GoTaq 0,1 μ L (1 U) e 8 μ L água (volume final 20 μ L). O produto da PCR foi verificado em gel de agarose 1% e enviado para sequenciamento no laboratório Wemseq. A qualidade das sequências foi verificada utilizando o software BioNumerics 7.6 e para alinhar as sequências utilizou-se o algoritmo de alinhamento múltiplo MUSCLE. A construção das árvores filogenéticas foram realizadas pelo método neighbor joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) utilizando o parâmetro Kimura 2 (Kimura, 1980). As sequências submetidas a análise filogenética foram aquelas com número de pares de base (pb) acima de 1000 para o gene 16S rRNA, acima de 363 pb para o gene *atpD* e acima de 562pb para o gene *gyrB*. O software utilizado para essa análise foi MEGA 7 com análise de confiança bootstrap de 1000 repetições. Foram incluídas na análise filogenética, dos três genes, sequências de estirpes tipo dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Paenibacillus* disponíveis no Genbank (National Center for Biotechnology information, NCBI), que apresentaram no mínimo 95% de similaridade com as sequências estudadas calculadas pelo BLAST. Toda análise filogenética foi transferida ao programa BioPython para obtenção da porcentagem de dissimilaridade entre sequências.

2.3 Amplificação do gene simbiótico *nifH*

Para a amplificação do gene *nifH* foi preparado um mix de PCR para volume final 20 μ L contendo: 7,6 μ L H₂O, 4 μ L tampão KCl para PCR (10X), 1,2 μ L MgCl₂ (2,5 mM), 0,8 μ L dNTP (0,2 mM), 1 μ L iniciador (10 mM), 0,4 μ L de Taq DNA polimerase (5U μ L⁻¹) e 4 μ L da extração do DNA de todas as estirpes. Detalhes dos iniciadores utilizados e programação do termociclador estão na tabela 2. Para verificar a amplificação do gene

nifH foi preparado um gel de agarose 1%, o qual foi visualizado e fotodocumentado em aparelho Transiluminador com luz ultravioleta.

2.4 Experimentos de autenticação e eficiência simbiótica de isolados

Foram feitos três experimentos em casa de vegetação, no Setor de biologia, microbiologia e processos biológicos do solo (UFLA). Cada experimento constou de uma das espécies florestais da subfamília Papilionoideae: *Ormosia arborea*, *Machaerium nyctitans* e *Platypodium elegans*. Sementes de *M. nyctitans* e *P. elegans* foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito 2% por 3 horas, sem necessidade de quebra de dormência. Para *O. arborea* foi realizada a quebra de dormência física através de imersão em ácido sulfúrico P.A. por 15 minutos e, posteriormente, lavagem em água corrente por mais 15 minutos para retirada de resíduos e assim poder ser desinfestada como as demais. Estas sementes foram colocadas em bandejas contendo areia estéril para germinar, sendo umedecidas com água destilada estéril. Após a formação de plântulas, as mesmas foram transplantadas para tubetes de 250 cm³ contendo uma mistura de areia e vermiculita 1:1 (v/v) estéril. No momento do transplântio as plântulas foram inoculadas com estirpes bacterianas da coleção da UFLA, previamente isoladas (Costa, 2014). Os isolados foram inoculados em meio líquido 79 (Fred;Waksman, 1928) e incubados em câmara agitadora a 150 rpm. O tempo de crescimento de cada isolado foi: 6 dias ou mais (crescimento lento), 4 a 5 dias (intermediário) e até 3 dias (rápido), de modo que todos os inoculantes ficaram prontos no mesmo dia para a inoculação. Os tratamentos dos três experimentos contaram com controle absoluto (com baixo teor de nitrogênio), controle positivo com adubação nitrogenada mineral, controle positivo com estirpe aprovada pelo MAPA para *Ormosia nitida* (BR4101) (MAPA, 2011) e os tratamentos inoculados com os isolados para cada espécie florestal (tabela 1). Para as outras espécies não foi utilizado o mesmo controle positivo, pois não há estirpe aprovada pelo MAPA para os gêneros *Machaerium* e *Platypodium*. Os tubetes receberam fertirrigação a partir de aplicação de solução nutritiva (D. R. Hoagland; D. I. Arnon, 1950) com modificação para os tratamentos inoculados e controle absoluto com doses baixas de nitrogênio (5,25 mg L⁻¹ de N) considerado dose de arranque. A solução estoque para o volume de 4 L teve as seguintes quantidades: 0,1 mL de NH₄H₂PO₄ (114 g L⁻¹); 0,6 mL de KNO₃ (101,11 g L⁻¹); 0,4 mL de Ca(NO₃)₂.4H₂O (236,16 g L⁻¹); 2 mL de MgSO₄.7H₂O (246,9 g L⁻¹); 3 mL de K₂SO₄ (87,13 g L⁻¹); 10 mL de Ca(H₂PO₄)₂.H₂O (12,6 g L⁻¹); 200 mL de CaSO₄.2H₂O

(1,72 g L⁻¹); 10 mL de FeCl₃ (1,4%) e 1 mL de micronutrientes (2,86 mg L⁻¹ H₃BO₃; 2,03 mg L⁻¹ MnSO₄.4H₂O; 0,22 mg L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,09 mg L⁻¹ Na₂MoO₄.H₂O).

As avaliações dos experimentos foram feitas aos 60, 90 e 150 dias após o transplântio para as espécies, *M. nycitans*, *P. elegans* e *O. arborea*, respectivamente. O critério utilizado para a escolha do tempo de condução dos experimentos foi o tamanho de sementes, pois quanto maior a semente maior a reserva energética e maior o tempo de senescência dos cotilédones, o que poderia influenciar na resposta da nodulação. O índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) foi determinado 60 dias após o transplântio para todas as espécies florestais estudadas, sendo esta a primeira medição. Para *Platypodium* e *Ormosia* foi realizada uma segunda medição ao final do experimento (90 e 150 dias, respectivamente). Após a coleta foram avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR), conteúdo de nitrogênio na parte aérea em g N.g planta⁻¹ (CNPA) e conteúdo total de nitrogênio da planta em g N. planta⁻¹ (CTN). O CNPA foi avaliado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com (Sarruge, J. R.; Haag, 1974), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea e o CNT obtido por meio do cálculo: CNPA x MSPA.

2.5 Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições para o experimento com *P. elegans* e três repetições para experimentos com *M. nycitans* e *O. arborea* (número de repetições adotado foi devido à baixa germinação das sementes). Para os parâmetros NN, MSN, MSR, MSPA, MST, SPAD1 (primeira medição), SPAD2 (segunda medição), CNPA e CTN realizou-se análise de variância (ANOVA) e suas medias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro com software SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011), foi feita transformação de dados para as variáveis NN e MSN $(X + 1)^{0,5}$. Além disso, foi aplicada análise de correlação linear de Pearson para todas as variáveis no software Sigmaplot para Windows versão 11.0.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação das estirpes

A análise filogenética das sequências obtidas anteriormente por Costa (dados não publicados) e Costa (2018), do gene 16S rRNA (Fig. 1) mostrou que as estirpes UFLA01-834, UFLA01-839, UFLA01-814, UFLA01-860 e UFLA01-1136 compartilharam 99,9% de similaridade com *B. embrapense* SEMIA 6208^T com bootstrap 64%. As estirpes UFLA01-1134, UFLA01-1137, UFLA01-1129, UFLA01-1128 e UFLA01-1127 formaram um agrupamento separado com bootstrap 43%, compartilhando 99,9% de similaridade com *R. miluonense* CCBAU 41251^T, *R. lusitanum* P1-7^T e *R. mayense* CCGE 526^T e 99,36% com *R. tropici* CIAT 899^T, mostrando o alto grau de conservação das sequências de nucleotídeos. As estirpes UFLA01-1147, UFLA01-1172, UFLA01-874 e UFLA01-1169 formaram clados isolados. As espécies mais próximas de cada uma são: *R. mesosinicum* CCBAU 25010^T e *R. alamii* GBV016^T com 99,44% de similaridade com UFLA01-1147; *R. helianthi* Xi19^T e *R. tarimense* PL-41^T com 98,14% de similaridade com UFLA01-1172; *B. rifense* CTAW71^T com 99,47% de similaridade com UFLA01-874 e *B. liaoningense* LMG 18230^T com 99,81% de similaridade com UFLA01-1169; respectivamente. Foi observada similaridade com as espécies *P. cellulositrophicus* P2-1^T, *P. favisporus* GMP01^T, *P. cineris* LMG 18439^T e *P. rhizosphaerae* CECAP06^T da estirpe UFLA01-1152 em 99,34%, 99,47%, 99,65% e 99,50%, respectivamente e da estirpe UFLA01-1157 em 99,56%, 99,68%, 99,87% e 99,72%, respectivamente (Figura 1).

Na análise filogenética concatenada dos genes *housekeepings atpD* e *gyrB* (Fig. 2) observou-se o agrupamento das estirpes UFLA 01-1134, UFLA 01-1128, UFLA 01-1127, UFLA 01-1129 e UFLA 01-1137 com 100% de similaridade, as quais assemelharam-se com maior proximidade da espécie *R. tropici* CIAT899 com bootstrap 66% e 93,33% de similaridade. Na análise concatenada a estirpe UFLA 01-1156 formou um cluster separado da espécie *R. calliandrae* CCGE524^T com bootstrap 63% e 93,33% de similaridade. A estirpe UFLA 01-839 também formou um cluster separado das demais espécies, tendo como espécie mais próxima *B. tropiciagri* SEMIA 6148^T com bootstrap 93% e similaridade entre eles de 97,94%. A estirpe UFLA 01-1164 foi identificada com o gênero *Bradyrhizobium*, no entanto observa-se na análise concatenada (*atpD* e *gyrB*) que ela separou-se das demais espécies conhecidas, podendo ser uma espécie de *Bradyrhizobium* ainda não descrita. O mesmo ocorre para a estirpe UFLA01-1172 que foi identificada no gênero *Rhizobium*, a qual separou-se das demais espécies formando um novo clado e levantando a possibilidade de nova espécie.

Dentre as estirpes que formaram um novo clado com bootstrap 100%, todas foram isoladas da mesma espécie florestal, com exceção da estirpe UFLA01-1136 que foi isolada de *Platypodium elegans*, acompanhando o clado das estirpes UFLA01-860, UFLA01-814, UFLA01-814, UFLA01-834 e UFLA01-839 isoladas de *Machaerium nyctitans*, mostrando que há possibilidade de proximidade filogenética entre estirpes isoladas de espécies florestais diferentes. Dentre as estirpes que formaram clados isolados a estirpe UFLA01-1136 assim como seu clado foi posicionada na árvore do gene 16S rRNA no superclado de *Bradyrhizobium elkanii*, já as estirpes UFLA01-1169, UFLA01-1164 e UFLA01-874 no superclado de *Bradyrhizobium japonicum*.

Das estirpes UFLA01-883 e UFLA01-1136, só foi possível amplificar o gene *gyrB*, as quais formaram clados separados, ambas pertencentes ao superclado de *Bradyrhizobium elkanii* com maior proximidade das espécies *Bradyrhizobium pachyrhizi* LMG 24246^T com 98,57% de similaridade e *Bradyrhizobium viridifuturi* SEMIA 690^T com 97,70% de similaridade, respectivamente.

3.2 Experimentos de autenticação e eficiência simbiótica

Nos tratamentos controle absoluto e adubação nitrogenada mineral não houve formação de nódulo, comprovando ausência de contaminação nos experimentos. A estirpe recomendada para inoculação em *Ormosia nitida* (BR4101) apresentou nodulação positiva nos experimentos com *Ormosia arborea* e *Platypodium elegans*. No entanto, não foi detectada nodulação desta em *Machaerium nyctitans*.

Das 21 estirpes avaliadas nos experimentos de autenticação em casa de vegetação 17 nodularam, sendo nove isoladas de *Machaerium nyctitans*, seis isoladas de *Platypodium elegans* e quatro isoladas de *Ormosia arborea*. Dentre as estirpes que nodularam foi possível amplificar o gene *nifH* de 12: UFLA01-814, UFLA01-834, UFLA01-839, UFLA01-860, UFLA01-883, UFLA01-1164, UFLA01-1172, UFLA01-1128, UFLA01-1137, UFLA01-1136, UFLA01-1156, UFLA01-1152 e UFLA01-1169 (Figura 5).

Analisando os dados morfofisiológicos de *M. nyctitans* (Tabela 3) os tratamentos não apresentaram diferença significativa para número de nódulos. No entanto, a estirpe UFLA 01-839 se destacou em relação à massa seca de nódulos refletindo no valor dos demais atributos avaliados (39,67 mg planta⁻¹), sendo estes similares estatisticamente do

controle com adubação nitrogenada mineral. Com relação ao índice SPAD, o tratamento com essa estirpe também se destacou, ele foi de 36,00 enquanto que no controle com adubação nitrogenada mineral foi de 38,47, mostrando eficiência na obtenção do nitrogênio. Ao se avaliar a correlação entre SPAD x CTN e SPAD x MSN obteve-se correlações positivas e significativas com coeficientes de correlação 0,821 e 0,475, respectivamente a $P < 0,01$. Isso mostra que quanto maior o SPAD, maior o teor de nitrogênio das plantas e maior a massa seca de nódulos.

Nos dados morfofisiológicos do experimento de autenticação em *P. elegans* (Tabela 4) houve diferença significativa em NN e MSN com destaque para as estirpes UFLA 01-874 e UFLA 01-1136 com médias de 3,8 e 14,2 nódulos por planta e 2,6 e 8,4 mg de nódulos por planta. O índice SPAD na primeira medição (SPAD1) não resultou em diferença estatística significativa, já na segunda medição (SPAD2) os tratamentos UFLA01-874, UFLA01-1132 e UFLA01-1137 foram superiores dos demais e estatisticamente iguais ao controle positivo (com N mineral) e controle absoluto. As plantas inoculadas com as estirpes UFLA01-1127, UFLA01-1129 E UFLA01-1137 possuíram valor total de N igual ao tratamento com adubação nitrogenada mineral. Os demais atributos não apresentaram diferença significativa entre as estirpes e os controles. O SPAD1 teve correlação positiva e significativa com o teor de nitrogênio das plantas com coeficiente de correlação 0,281 e $P < 0,05$.

Nos dados morfofisiológicos do experimento de autenticação em *O. arborea* (Tabela 5) houve diferença significativa no NN e MSN entre tratamentos com destaque para a estirpe UFLA 01-1169 com média de 96 nódulos por planta e 92,33 mg de nódulos por planta, este tratamento superou a nodulação do tratamento com a estirpe recomendada para essa espécie (BR4101). As estirpes UFLA 01-1157, UFLA 01-1156, UFLA 01-1169 e UFLA 01-1147 apresentaram nodulação positiva, porém não foi verificada diferença significativa nos atributos morfofisiológicos. Pode-se observar que no tratamento com nitrogênio mineral foram obtidos os maiores valores de matéria seca da parte aérea, SPAD e teor relativo e total de nitrogênio das plantas, superando os tratamentos inoculados, inclusive pela estirpe recomendada para essa cultura. O índice SPAD só mostrou diferença a partir da segunda avaliação, porém houve correlação positiva entre os valores da primeira e segunda medição com coeficiente de correlação 0,529 e $P < 0,01$, além de

correlação positiva entre os valores de SPAD1 e SPAD2 com o conteúdo total de N das plantas (CTN) com coeficiente de correlação 0,511 e 0,481, respectivamente e $P < 0,01$.

4. DISCUSSÃO

A identificação de estirpes formando clados diferentes dentro da árvore filogenética com os valores de similaridade abaixo de 95% indica possibilidade de pelo menos cinco novas espécies ainda não descritas. Em trabalho de descrição de nova espécie de *Bradyrhizobium*, da Costa et al. (2018) encontrou valores de similaridade 95,7–94,4 e 96,7–95,0%, quando analisadas sequências de genes *housekeeping*, corroborando o encontrado neste trabalho. Dentre elas, a estirpe UFLA01-839, que além de poder ser uma espécie potencialmente nova, se destacou no experimento com *M. nycitans*, podendo ser considerada para futuros testes de recomendação de inoculantes. Os resultados obtidos a partir da análise filogenética concatenada dos genes *housekeepings* realizada neste trabalho corroboram outros trabalhos nos quais o complemento da análise do gene 16S rRNA pelo sequenciamento de genes *housekeepings* melhora a discriminação de espécies tanto de *Bradyrhizobium* quanto de *Rhizobium* (Bourebaba et al., 2016; Degefu et al., 2017; Guimarães et al., 2012; Rouhrazi et al., 2016), inclusive o uso do *gyrB* como discriminador de táxons mostrou-se útil assim como no trabalho de Guimarães et al. (2015). Esse tipo de análise mostrou-se eficiente para separação das estirpes com maior potencial de serem de novos táxons, e assim fazer uso de outras técnicas capazes de catalogá-los, como o sequenciamento do genoma completo (Tak et al., 2017).

A posição filogenética das estirpes nos dois superclados (*B. elkanii* e *B. japonicum*) pode apresentar características únicas das mesmas. Apesar de esses dois superclados estarem bem espaçados filogeneticamente, foi possível obter isolados representantes aos dois, tanto de *M. nycitans* quanto de *P. elegans*. No caso das estirpes de *O. arborea* não foi identificado representante do gênero *Bradyrhizobium*. No entanto, conseguiu-se identificar isolados de *Rhizobium* e de *Paenibacillus*. Isso é um diferencial já que todas as estirpes recomendadas para leguminosas arbóreas segundo o MAPA (2011) pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*.

A estirpe UFLA01-1157, identificada como *Paenibacillus* sp., nodulou as raízes de *O. arborea*, no entanto não foi possível amplificar o gene *nifH* da mesma. Poucos estudos relatam a capacidade nodulífera de espécies deste gênero, sendo que na literatura há

registros de nodulação de estirpes desse gênero com *Trifolium pratense* (Latif et al., 2013) e com *Vigna unguiculata* (Da Costa et al., 2013). Surge uma vertente importante na descrição desse tipo de simbiose em futuros trabalhos, já que os organismos desse gênero são considerados endofíticos de nódulos (Lai et al., 2015; Menéndez et al., 2016; Pandya et al., 2015) e podem ter adquirido com o tempo a capacidade nodulífera por transferência horizontal de genes (Masson-Boivin and Sachs, 2018). A similaridade entre essa estirpe e as sequências de *Paenibacillus* que foram utilizadas para comparação filogenética foi alta (acima de 99,5%), demonstrando que a região do gene 16S rRNA é muito conservada, havendo necessidade de sequenciamento de outros fragmentos do DNA para identificação em nível de espécie.

As estirpes que não apresentaram nodulação podem ser organismos invasores, endofíticos de nódulo ou nodulíferos que não obtiveram condição favorável à sua nodulação. Uma das condições necessárias para a nodulação pode estar relacionada ao momento de inoculação, ou seja, se a inoculação for feita na ocasião do plantio, deve-se verificar o momento em que a plântula irá precisar de nitrogênio (deficiência), pois se a mesma ainda estiver possuir reservas da semente não necessitará estabelecer simbiose e não produzirá flavonóides sinalizadores que irão induzir os genes *nod* de rizóbios, o que poderá inviabilizar o processo de nodulação (Ndakidemi and Dakora, 2003). Essa demora no estabelecimento da simbiose pode refletir em respostas de testes de eficiência conforme observado nos experimentos do presente trabalho, nos quais não houve diferença significativa na massa seca das plantas. Algumas espécies florestais podem ser mais difíceis de serem utilizadas para testes de eficiência devido à dificuldade em apresentar homogeneidade de crescimento ao longo do tempo. Se a diferença entre tratamentos com adubação nitrogenada mineral recomendada ou deficiente (sem nenhuma fonte de N) não fizer com que as plantas apresentem diferenças significativas nas avaliações, mostra que é necessário submeter as plantas a um tempo maior de exposição a essas condições para que possam gerar diferenças significativas.

Apesar de não haver resposta na massa seca das plantas, a absorção de nitrogênio (N) fixado pelas bactérias pode ser quantificada direta ou indiretamente. O índice SPAD verifica indiretamente o teor de clorofila na parte aérea das plantas, dependendo da intensidade de verde nas folhas. No caso das plantas de *Machaerium* o índice SPAD conseguiu mostrar diferença estatística entre tratamentos antes do aumento da massa seca

mostrando ser uma análise útil para casos como este. Esses dados corroboram com os dados obtidos por Jaramillo et al. (2013), que obtiveram resposta do SPAD antes da diferenciação em massa seca em experimento de eficiência de inoculação em *Vigna unguiculata* (feijão caupi). Além disso, os valores calculados de correlação do índice SPAD com teor de nitrogênio foram positivos mostrando que é possível utilizar os valores desse índice como medida indireta da clorofila como resposta rápida em relação ao conteúdo de N das plantas. Nyoki & Ndakidemi (2014) citam os benefícios da inoculação de rizóbios e seu efeito na formação da clorofila, corroborando os dados obtidos neste trabalho. Estudos mostram que o aparecimento de nódulos em plantas do gênero *Machaerium* sem inoculação, surge a partir do 180º dia após o transplântio (Pastorini et al., 2016), no entanto foi verificada nodulação das plantas de *Macherium nycitans* neste trabalho ocorridas aos 60 dias após o transplântio, comprovando que através do processo de inoculação, as plântulas podem se favorecer da simbiose antes.

5. CONCLUSÃO

A análise filogenética de isolados a partir do sequenciamento de genes *housekeeping atpD* e *gyrB* permitiu a identificação mais precisa das estirpes do que o sequenciamento do gene 16S rRNA.

A partir da árvore concatenada dos genes *housekeeping atpD* e *gyrB* foi possível detectar estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com alto potencial de serem novas espécies, sendo elas: UFLA01-1134, UFLA01-1128, UFLA01-1127, UFLA01-1137, UFLA01-1129, UFLA01-1156, UFLA01-1172, UFLA01-1164 e UFLA01-839.

Foi comprovada simbiose entre dezoito estirpes e suas espécies florestais de origem. Em todas elas, exceto UFLA01-1127, UFLA01-874, UFLA01-1132, UFLA01-1157, UFLA01-1161 e UFLA01-1147, foi possível detectar o gene *nifH* em seu DNA.

Maior acúmulo de N e índice SPAD foram obtidos pela inoculação da estirpe UFLA01-839 nas mudas de *Machaerium nycitans* aos 60 dias e pela inoculação da estirpe UFLA01-1137 nas mudas de *Platypodium elegans* aos 90 dias após o plantio.

O presente trabalho permitiu a obtenção de dezoito rizóbios nodulíferos, os quais serão fonte de futuros trabalhos para testar a eficiência simbiótica dos mesmos em longo prazo, tanto em condições axênicas quanto em interação com substratos não estéreis, além

da sua identificação em nível de espécie, possibilitando avanço no desenvolvimento de novos inoculantes para espécies florestais.

Agradecimentos

À Fundação de amparo a pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro na concessão de bolsa. Ao CNPq e CAPES pela infraestrutura e financiamento de todo o corpo estudantil e docente que fez parte deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borges, W.L., Prin, Y., Ducouso, M., Roux, C. Le, De Faria, S.M., 2016. Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.009>
- Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Palacios, J.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L., 2016. Diversity of Bradyrhizobium strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.006>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., Burgmann, H., 2012. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4481–4489. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Costa, J.S., 2014. Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro. Universidade Federal de Lavras.
- Costa, E.M., Guimarães, A.A., de Carvalho, T.S., Rodrigues, T.L., Ribeiro, P.R. de A., Lebbe, L., Willems, A., Moreira, F.M. de S., 2018. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch. Microbiol.* 0, 0. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>
- Costa, E.M., Nóbrega, R.S.A., De Carvalho, F., Trochmann, A., Ferreira, L. de V.M., Moreira, e. F.M. de S., 2013. Promoção do crescimento vegetal e diversidade

- geńtica de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 48, 1275–1284. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., Woliy, K., Frosteg rd,  ., 2017. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of tree and annual legume species growing in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.04.001>
- Fred, E.B., Waksman, S.A., 1928. *Laboratory Manual of General Microbiology*. McGraw-Hill Book, New York.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2037–2048. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>
- Guimarães, A.A., Florentino, L.A., Almeida, K.A., Lebbe, L., Silva, K.B., Willems, A., Moreira, F.M. de S., 2015. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>
- Guimarães, A.A., Jaramillo, P.M.D., Nóbrega, R.S.A., Florentino, L.A., Silva, K.B., de Souza Moreira, F.M., 2012. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6726–6733. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plant without soil.
- Jaramillo, P.M.D., , Amanda Azarias Guimarães, Ligiane Aparecida Florentino, Karina Barroso Silva, R.S., Nóbrega, A., Moreira, F.M. de S., 2013. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Sci. Agric.* 70, 397–404. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base

- substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Lai, W.A., Asif, A., Lin, S.Y., Hung, M.H., Hsu, Y.H., Liu, Y.C., Shahina, M., Shen, F.T., Young, C.C., 2015. *Paenibacillus medicaginis* sp. Nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*medicago sativa* l.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3853–3860. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000505>
- Latif, S., Khan, S., Naveed, M., Mustafa, G., Bashir, T., Mumtaz, A.S., 2013. The diversity of Rhizobia, Sinorhizobia and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. *Arch. Microbiol.* 195, 647–653. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0914-6>
- MAPA, 2011. Instrução Normativa SDA N° 13.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A., 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 489–503. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>
- Masson-Boivin, C., Sachs, J.L., 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story. *Curr. Opin. Plant Biol.* 44, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.H., Carro, L., Fernández Pascual, M., Klenk, H.P., Velázquez, E., Mateos, P.F., Peix, A., Scotti, M.R., 2016. *Paenibacillus periandrae* sp. nov., isolated from nodules of *Periandra mediterranea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1838–1843. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000953>
- Ndakidemi, P.A., Dakora, F.D., 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Funct. Plant Biol.* 30, 729–745. <https://doi.org/10.1071/FP03042>
- Nyoki, D., Ndakidemi, P.A., 2014. Effects of *Bradyrhizobium japonicum* and Phosphorus Supplementation on the Productivity of Legumes. *Int. J. Plant Soil Sci.* 3, 894–910. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2014/8412>
- Pandya, M., Rajput, M., Rajkumar, S., 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. *Microbiology*

84, 80–89. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010105>

Pastorini, L.H., Romagnolo, M.B., Barbeiro, C., De Oliveira Guerreiro, R.G., Da Costa, P.M., Sert, M.A., De Souza, L.A., 2016. Germinação e crescimento inicial de *Machaerium brasiliense* VOGEL (FABACEAE) em casa de vegetação. *Floresta* 46, 83–92. <https://doi.org/10.5380/ufv.v46i1.39625>

Rouhrazi, K., Khodakaramian, G., Velázquez, E., 2016. Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw024>

Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees'. *Science* (80-.). 4, 406–425.

Sarruge, J. R.; Haag, H.P., 1974. *Análises químicas em plantas*. Piracicaba/SP.

Tak, A., Gehlot, P., Pathak, R., Singh, S.K., 2017. *Rhizobium Biology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5>

Zahran, H.H., 2017. Legume-Microbe Interactions Under Stressed Environments, in: *Microbes for Legume Improvement*. pp. 301–339. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2>

6.2 Tabela 1.

Origem, caracterização cultural e identificação a nível de gênero das estirpes pelo sequenciamento do gene 16S rRNA utilizadas neste trabalho

Espécie de origem	Estirpe	Grupo cultura †	Gênero	Código de acesso	Referência
<i>Machaerium nycitans</i>	UFLA 01-814	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>	KF114634.1	
	UFLA 01-834	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>	KF114634.1	
	UFLA 01-839	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>	KF113098.2	(COSTA, 2014)
	UFLA 01-860	IAL	<i>Bradyrhizobium</i>	KF114634.1	
	UFLA 01-883	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>	JX284238.1	
	UFLA 01-1164	IAL	<i>Bradyrhizobium</i>		
	UFLA 01-1169	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>		(COSTA, 2018)
	UFLA 01-1172	RA	<i>Rhizobium</i>		
	UFLA 01-1147	RAL	<i>Rhizobium</i>		
<i>Ormosia arborea</i>	UFLA 01-1152	RAL	<i>Paenibacillus</i>		
	UFLA 01-1156	RN	<i>Rhizobium</i>		(COSTA, 2018)
	UFLA 01-1157	RA	<i>Paenibacillus</i>		
	UFLA 01-1161	IAL	<i>Bradyrhizobium</i>		
	UFLA 01-874	LAL	<i>Bradyrhizobium</i>	AJ431635.1	(COSTA, 2014)
<i>Platypodium elegans</i>	UFLA 01-1127	RN	<i>Rhizobium</i>		
	UFLA 01-1128	RA	<i>Rhizobium</i>		
	UFLA 01-1129	RA	<i>Rhizobium</i>		
	UFLA 01-1132	IAL	<i>Bradyrhizobium</i>		(COSTA, 2018)
	UFLA 01-1134	RA	<i>Rhizobium</i>		
	UFLA 01-1136	IAL	<i>Bradyrhizobium</i>		
	UFLA 01-1137	RA	<i>Rhizobium</i>		

† Características fenotípicas da cultura em meio 79: (IAL) crescimento intermediário (de 4 a 6 dias) e alcalinização do meio; (LAL) crescimento lento (7 dias ou mais) e alcalinização do meio, (RA) crescimento rápido (1 a 3 dias) e acidificação do meio, (RN) crescimento rápido sem mudança de pH.

Tabela 2

Iniciadores utilizados na PCR e as condições do termociclador

Iniciador	Sequência 5' – 3'	Ciclo de PCR	Referência
16S 27F	AGAGTTTGACCTGGCTCAG	[5'94°C, 40x(40''94°C, 40''55°C, 1'30''72°C)7'72°C]	(Lane, 1991)
16S 1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
gyrB 343F	TTCGACCAGAAYTCCTAYAAGG	[5'95°C, 5x(2'94°C, 2'57°C, 1'30''72°C), 28x(30''94°C, 1'57°,1'30''72°C), 5'72°C]	(Martens et al., 2007)
gyrB 1043R	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG		
atpD 352F	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG	[5'95°C, 2x(2'94°C, 1'64.3°C, 1'72°C), 30x(30''94°C, 1'72°C), 5'72°C]	(Gaunt et al., 2001; Martens et al., 2007)
atpD 871R	AGMGCCGACACTTCMGARCC		
nifH 515F	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC	[5'94°C, 35x(40''94°C, 40''58°C, 1'30''72°C)7'72°C]	(Brankatschk et al., 2012) modificado
nifH 806R	TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT		

Tabela 3.

Desempenho dos isolados de Jacarandá bico-de-pato (*Machaerium nyctitans*) avaliados quanto ao número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), índice SPAD (SPAD), concentração de nitrogênio na planta (CNPA) e conteúdo total de nitrogênio por planta (CTN), 60 dias após o plantio, em experimento de casa de vegetação com condições axênicas. Dados médios de três repetições.

Tratamento de inoculação	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	SPAD 1	CNPA	CTN
	nod planta ⁻¹	mg planta ⁻¹		g planta ⁻¹			mg N g planta ⁻¹	mg N planta ⁻¹
UFLA 01-814	25 a	2,33 c	0,23 a	0,13 a	0,36 a	23,43 b	16,70 d	3,88 c
UFLA 01-834	45 a	3,67 c	0,24 a	0,12 a	0,37 a	24,27 b	17,36 d	4,22 c
UFLA 01-839	49 a	39,67 a	0,29 a	0,07 a	0,40 a	36,00 a	28,17 b	8,35 b
UFLA 01-860	41 a	1,67 c	0,22 a	0,10 a	0,33 a	25,50 b	17,20 d	3,83 c
UFLA 01-883	41 a	11,00 b	0,23 a	0,10 a	0,35 a	25,40 b	21,47 c	4,98 c
UFLA 01-1164	55 a	15,00 b	0,18 a	0,10 a	0,29 a	28,07 b	23,03 c	4,12 c
UFLA 01-1172	23 a	1,33 c	0,15 a	0,07 a	0,22 a	25,77 b	20,23 c	2,77 c
BR4101	10 b	2,67 c	0,24 a	0,15 a	0,40 a	26,13 b	16,20 d	3,93 c
Nitrogênio mineral	0 b	0,00 c	0,34 a	0,12 a	0,46 a	38,47 a	34,27 a	11,72 a
Controle absoluto	0 b	0,00 c	0,26 a	0,15 a	0,41 a	25,57 b	17,76 d	4,55 c
CV%	74	48,5	25,46	30,85	24,30	9,59	13,27	32,48

*Dados seguidos de mesma letra na coluna não possuem diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação

Tabela 4.

Desempenho dos isolados de Jacarandá do campo (*Platypodium elegans*) avaliados quanto ao número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), índice SPAD aos 60 dias após o plantio (SPAD 1), índice SPAD aos 90 dias após o plantio (SPAD 2), concentração de nitrogênio na planta (CNPA) e conteúdo total de nitrogênio por planta (CTN), 60 dias após o plantio, em experimento de casa de vegetação com condições axênicas. Dados médios de cinco repetições

Tratamento de inoculação	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	SPAD 1	SPAD 2	CNPA	CTN
	nod planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	g planta ⁻¹					mg N g planta ⁻¹	mg N planta ⁻¹
UFLA 01-1127	1,6 b	1,4 b	0,16 a	0,3 a	0,45 a	32,67 a	26,18 b	17,22 a	2,82 a
UFLA 01-1128	0,2 b	0,6 b	0,12 a	0,2 a	0,32 a	37,44 a	26,03 b	22,50 a	2,27 b
UFLA 01-1129	0,0 b	0 b	0,16 a	0,4 a	0,60 a	33,62 a	29,10 b	19,12 a	2,98 a
UFLA 01-874	3,8 a	2,6 b	0,14 a	0,2 a	0,37 a	34,62 a	31,52 a	18,26 a	2,54 b
UFLA 01-1134	0 b	0,0 b	0,14 a	0,2 a	0,37 a	34,02 a	28,18 b	18,12 a	2,45 b
UFLA 01-1132	0,4 b	0,2 b	0,13 a	0,5 a	0,59 a	40,78 a	32,14 a	20,34 a	2,51 b
UFLA 01-1137	0,4 b	1,0 b	0,17 a	0,3 a	0,49 a	36,62 a	32,40 a	18,60 a	3,10 a
UFLA 01-1136	14,2 a	8,4 a	0,13 a	0,3 a	0,41 a	35,42 a	25,90 b	11,08 a	2,50 b
BR4101	0,2 b	0,0 b	0,14 a	0,2 a	0,34 a	32,95 a	29,17 b	17,10 a	2,18 b
Nitrogênio mineral	0 b	0,0 b	0,14 a	0,3 a	0,49 a	36,98 a	33,42 a	26,64 a	3,72 a
Controle absoluto	0 b	0,0 b	0,15 a	0,4 a	0,50 a	39,20 a	34,70 a	20,74 a	3,07 a
CV%	65	0,21	25,52	57,38	43,26	13,62	15,97	32,34	28,63

*Dados seguidos de mesma letra na coluna não possuem diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação

Tabela 5.

Desempenho dos isolados de Olho-de-cabra (*Ormosia arborea*) avaliados quanto ao número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST), índice SPAD aos 60 dias após o plantio (SPAD 1), índice SPAD aos 150 dias após o plantio (SPAD 2), concentração de nitrogênio na planta (CNPA) e conteúdo total de nitrogênio por planta (CTN), 60 dias após o plantio, em experimento de casa de vegetação com condições axênicas. Dados médios de três repetições

Tratamento de inoculação	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	SPAD 1	SPAD 2	CNPA	CTN
	nódulo planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	g planta ⁻¹					mg N g planta ⁻¹	mg N planta ⁻¹
UFLA 01-1157	1 b	0,67 c	0,84 b	0,42 a	1,26 b	28,63 a	30,10 b	13,40 b	11,11 b
UFLA 01-1156	2 b	1,33 c	0,71 b	0,48 a	1,20 b	30,47 a	28,53 b	15,47 b	9,05 b
UFLA 01-1161	0,3 b	24,67 c	0,86 b	0,44 a	1,33 b	27,87 a	26,30 b	11,90 b	10,29 b
UFLA 01-1169	96 a	92,33 a	0,85 b	0,50 a	1,44 b	30,33 a	25,93 b	11,40 b	9,60 b
UFLA 01-1147	1 b	0,33 c	1,09 b	0,75 a	1,83 b	28,93 a	27,00 b	10,53 b	11,23 b
UFLA 01-1152	0 b	0,00 c	0,96 b	0,61 a	1,57 b	29,20 a	22,72 b	10,40 b	10,06 b
BR4101	4 b	45,67 b	1,22 b	0,59 a	1,85 b	30,50 a	25,97 b	16,70 b	14,13 b
Nitrogênio mineral	0 b	0,00 c	2,20 a	1,00 a	3,20 a	35,07 a	35,93 a	25,53 a	55,17 a
Controle absoluto	0 b	0,00 c	0,88 b	0,80 a	1,68 b	27,23 a	23,57 b	12,23 b	10,34 b
CV%	35	1,2	38	46	39	13	13	34,18	25,23

*Dados seguidos de mesma letra na coluna não possuem diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação

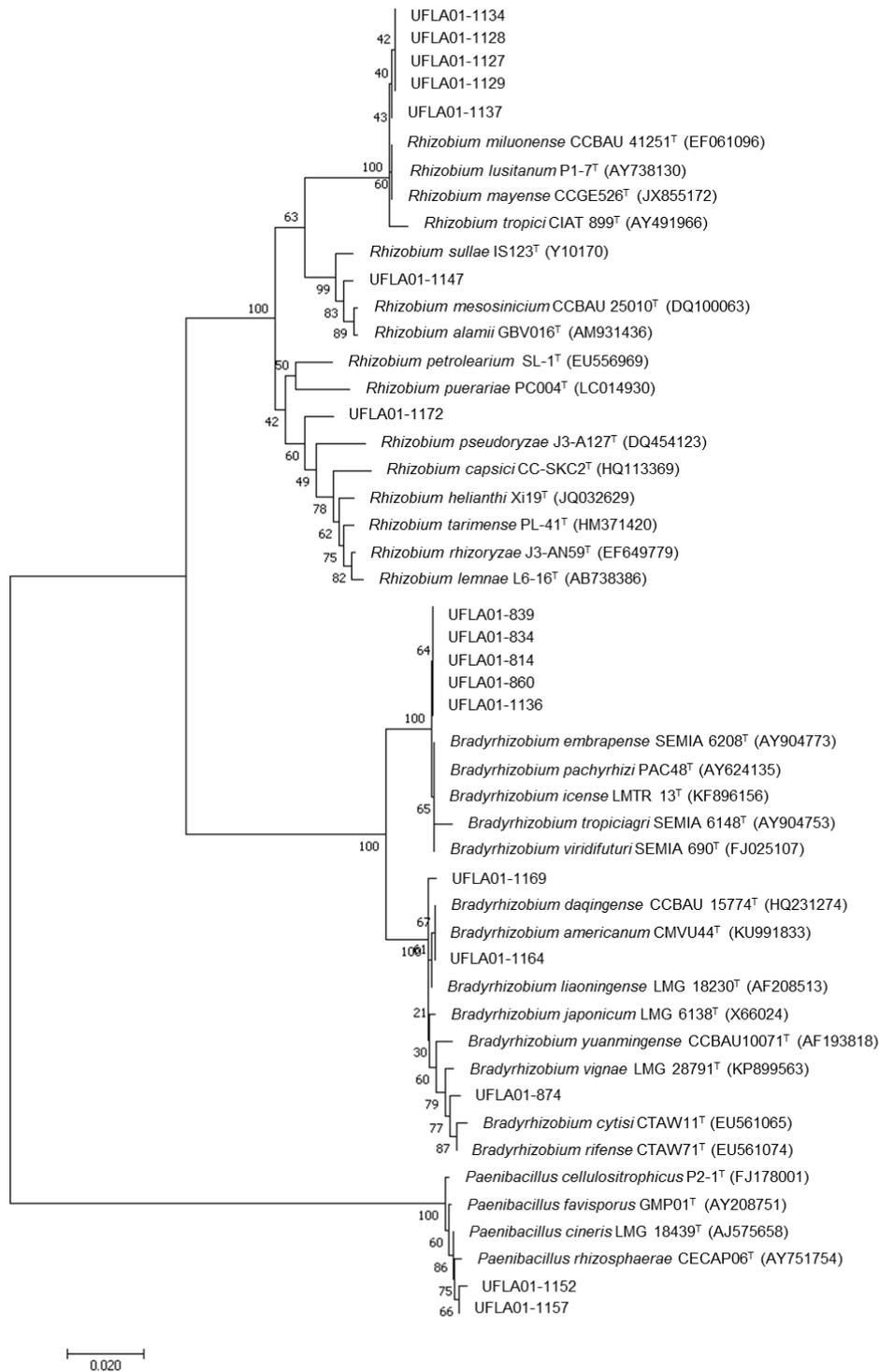


Fig. 1.

Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA de 21 isolados de bactérias utilizadas nos experimentos de autenticação da nodulação em *M. nycitans*, *P. elegans* e *O. arbórea* e trinta e dois espécies de referência

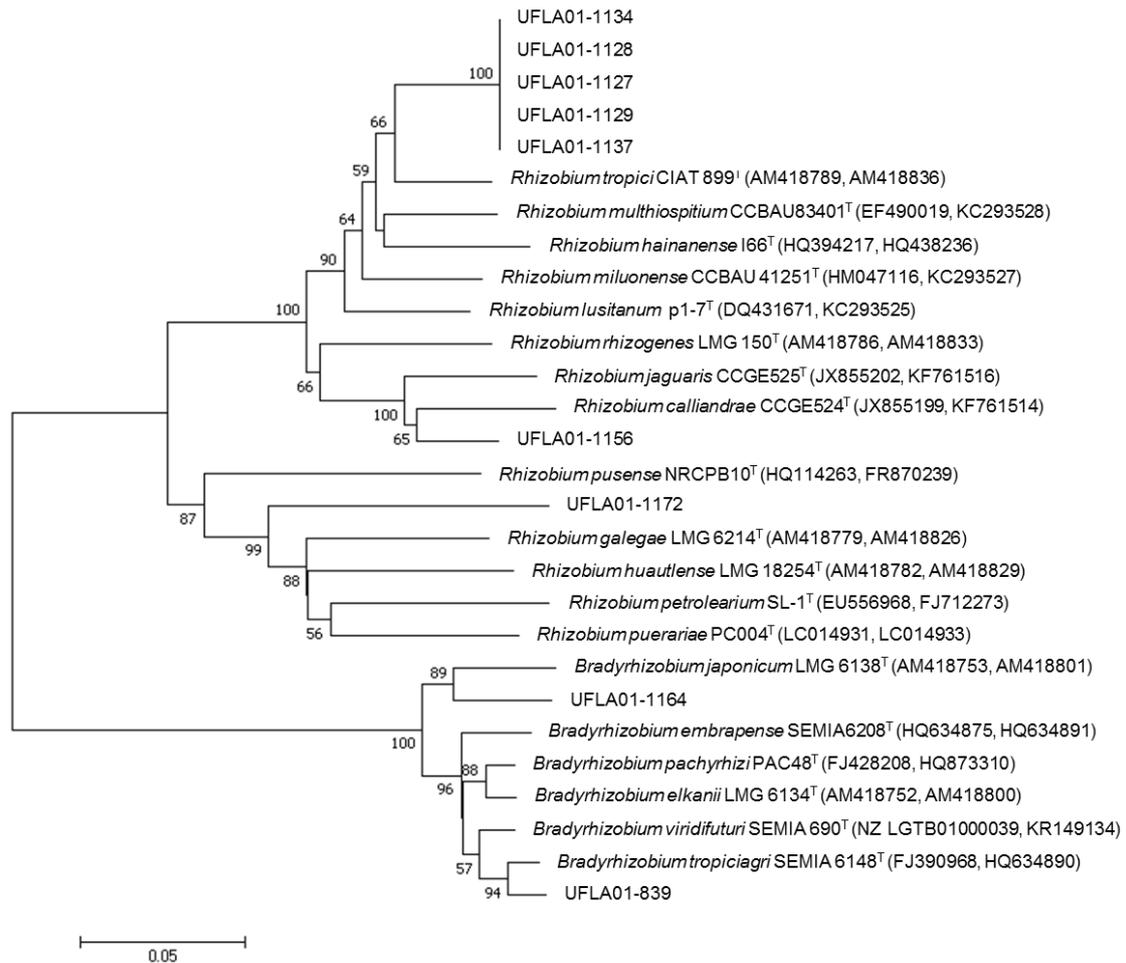


Fig 2.

Árvore filogenética baseada nas seqüências dos genes *atpD* e *gyrB* de nove isolados de bactérias utilizadas nos experimentos de autenticação da nodulação em *M. nyctitans*, *P. elegans* e *O. arbórea* e 19 espécies de referência



Fig.3.

Fotografia com luz ultravioleta em Transiluminador dos géis de agarose 1% referentes às bandas específicas do gene *nifH* amplificado dos isolados estudados.

MATERIAL SUPLEMENTAR

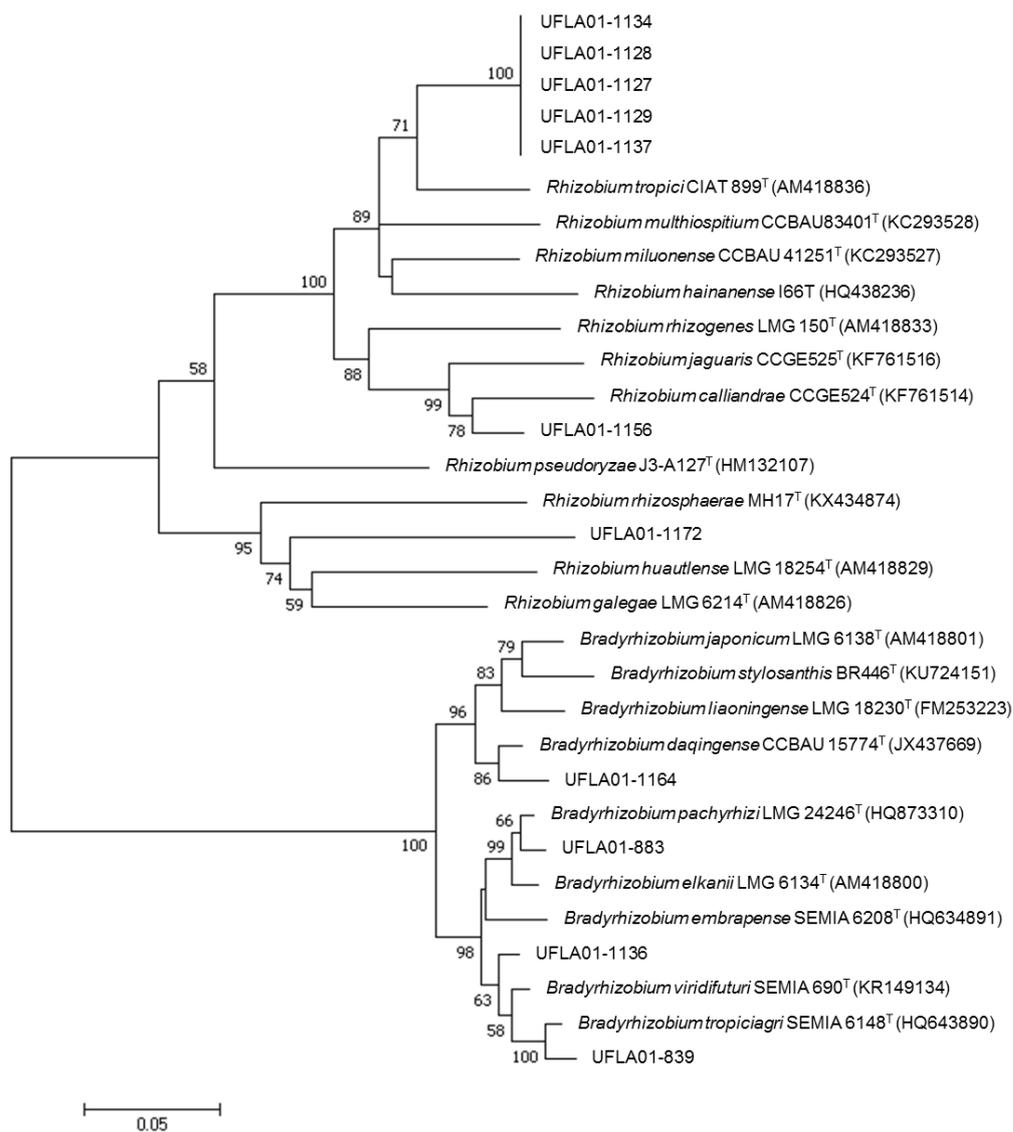


Figura S1. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* de 11 isolados de bactérias utilizadas nos experimentos de autenticação da nodulação em *M. nycitans*, *P. elegans* e *O. arbórea* e 20 espécies de referência

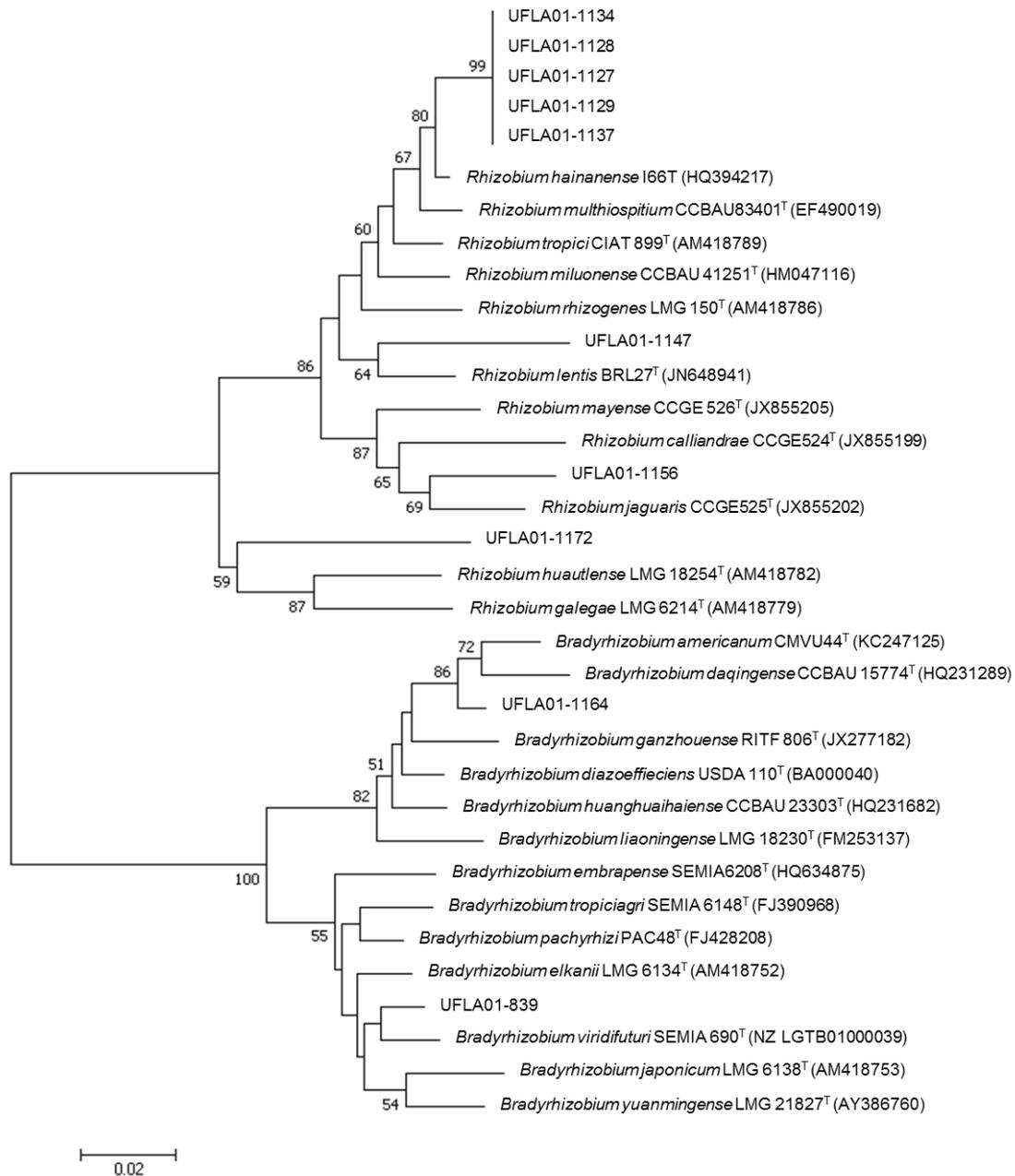


Figura S2. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *atpD* de 10 isolados de bactérias utilizadas nos experimentos de autenticação da nodulação em *M. nycitans*, *P. elegans* e *O. arborea* e 24 espécies de referência

Tabela S1. Tamanho das sequências de cada estirpe utilizada no presente trabalho em pares de base (pb) para os genes 16S rRNA, *atpD* e *gyrB*

Estirpes	Tamanho das sequências por gene (pb)		
	16S rRNA	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>
UFLA 01-814	1207		677
UFLA 01-834	1168		
UFLA 01-839	1205	379	654
UFLA 01-860	1311		666
UFLA 01-883	582		389
UFLA 01-1164	1269	419	562
UFLA 01-1169	1265		676
UFLA 01-1172	1259	504	678
UFLA 01-1147	1237	503	
UFLA 01-1152	1297		
UFLA 01-1156	685	416	674
UFLA 01-1157	822		
UFLA 01-1161	790		672
UFLA 01-874	1280		
UFLA 01-1127	1001	483	680
UFLA 01-1128	1220	435	681
UFLA 01-1129	1204	363	680
UFLA 01-1132	1068		656
UFLA 01-1134	1264	498	689
UFLA 01-1136	1095		674
UFLA 01-1137	1266	433	666