



JULIANA DOS SANTOS COSTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA, GENÉTICA E
SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE DIFERENTES LEGUMINOSAS
FLORESTAIS EM VIVEIRO**

**LAVRAS – MG
2014**

JULIANA DOS SANTOS COSTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA, GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE DIFERENTES
LEGUMINOSAS FLORESTAIS EM VIVEIRO**

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

Dra. Amanda Azarias Guimarães

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Costa, Juliana dos Santos.

Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias
isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro /
Juliana dos Santos Costa. – Lavras : UFLA, 2014.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Nitrogênio - Fixação. 2. Sequenciamento 16S rRNA. 3.
Macoptilium atropurpureum. 4. Recuperação de área degradada. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.90133

JULIANA DOS SANTOS COSTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA, GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE DIFERENTES
LEGUMINOSAS FLORESTAIS EM VIVEIRO**

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Julho de 2014.

Dr. Warley Augusto Caldas Carvalho	UFLA
Dra. Fernanda de Carvalho	UFLA
Dra. Amanda Azarias Guimarães	UFLA

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

A Deus, pela constante presença em minha vida. À minha mãe, Maria pelo apoio, incentivo, carinho e dedicação, ao meu pai Joaquim (in memoriam). Aos meus avós Ambrosina e Antônio pelo carinho e apoio e Júlia e Teófilo (in memoriam).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Ciência do Solo pelos ensinamentos e boa convivência.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Fatima M. S. Moreira pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e ensinamentos. À Dra. Amanda A. Guimarães, pela coorientação, confiança, ensinamentos, amizade e competência.

Ao projeto CRA-RDP-00136-10 (FAPEMIG / FAPESP / FAPESPA / VALE S.A.), “Diversidade de plantas e de organismos do solo com potencial biotecnológico e indicadores de recuperação ambiental em Minas Gerais”, Vale, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições apresentadas.

Aos técnicos Marlene e Manuel, pela contribuição, amizade e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo por tornar a caminhada mais leve, pelas risadas, conselhos e incentivo.

Às minhas amigas Nathália, Érica, Kaliane, Estephane, Emanuelle, Ana Elisa, Roberta, Lívia pelos ótimos momentos, pelo apoio e carinho.

Ao Rodrigo, por todo o apoio e compreensão, sempre junto de mim, mesmo estando longe.

À Rayssa, pela amizade, paciência, companheirismo, risadas, ensinamentos, dedicação e competência.

À minha mãe Maria, por sempre ter acreditado em mim e me apoiado, por todo o esforço que fez para que eu pudesse estudar, por ter me ajudado em tudo neste mestrado, por todo amor, carinho, dedicação e ao meu pai Joaquim (in memoriam) que sempre estará comigo, a toda minha família pelo apoio e carinho.

RESUMO

As atividades de mineração e processamento de minérios são de grande importância socioeconômica, entretanto, podem alterar o meio ambiente. O estudo da diversidade e a aplicação biotecnológica de bactérias fixadoras de nitrogênio que possam atuar na promoção de crescimento de plantas é uma alternativa para mitigar os impactos da mineração. Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade genotípica, fenotípica e simbiótica de bactérias nodulíferas que estabelecem simbioses radiculares com mudas de leguminosas produzidas em viveiro em área de mineração. Para isto, a coleta dos nódulos foi realizada no viveiro pertencente à Mina de Córrego do Meio, Propriedade da VALE, no município de Sabará, MG. No viveiro havia 20 espécies de leguminosas e foram encontrados nódulos em 11, os nódulos foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 e todos os morfotipos obtidos foram isolados e caracterizados culturalmente. Posteriormente, realizou-se experimento para autenticar e avaliar a eficiência desses isolados na fixação de nitrogênio em simbiose com siratro (*Macropitilium atropurpureum*). O experimento foi realizado em tubetes contendo areia e vermiculita (1:1), sendo os controles, os tratamentos sem inoculação de estirpes (com alto e baixo teor de nitrogênio mineral) e com inoculação das estirpes de referência para siratro na fixação biológica de nitrogênio UFLA 04-0212 e SEMIA 656. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições, conduzido por um período de 45 dias. Após este período foram avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos, matéria seca do nódulo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca total e eficiência relativa. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para verificar a diversidade genética realizou-se a extração do DNA genômico e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram obtidos 92 isolados em cultura pura, a distribuição destes de acordo com seu tempo de crescimento e reação do indicador de pH do meio formaram nove tipos culturais, 17 isolados apresentaram crescimento rápido com acidificação do meio, 12 apresentaram crescimento rápido sem alteração do pH do meio, 10 apresentaram crescimento rápido e alcalinizaram o meio, seis apresentaram crescimento intermediário acidificando o meio, cinco apresentaram crescimento intermediário sem modificar o pH do meio, sete apresentaram crescimento intermediário com alcalinização do meio, um apresentou crescimento lento acidificando o meio, um apresentou crescimento lento sem modificar o pH do meio e 33 apresentaram crescimento lento alcalinizando o meio. No experimento de autenticação e eficiência simbiótica, 90% dos isolados nodularam, a eficiência relativa das estirpes autenticadas foi variável, sendo que 10% dos isolados promoveram aumento estatisticamente superior ao controle com alto teor de N, ou seja,

apresentaram alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Das 92 estirpes isoladas foram sequenciadas 37, representantes dos diferentes grupos culturais, as quais foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Bosea*, *Cohnella* e *Leifsonia*. Os resultados mostraram alta diversidade genética, fenotípica e simbiótica.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Caracterização cultural. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. *Macroptilium atropurpureum*. Recuperação de áreas degradadas.

ABSTRACT

Mining and mineral dressing activities have a social and economic importance, but they can alter the environment. The study on the diversity and biotechnological application of nitrogen-fixing bacteria, which play a role on promoting plant growth are an alternative to mitigate some mining impacts. Thus, the aim of this work was to evaluate the genotypic, phenotypic, and symbiotic diversity of nodulating bacteria that establishes root symbioses with legume plants grown in a greenhouse in the mining area. For this purpose, the nodules were collected in the greenhouse belonging to Mina de Córrego do Meio, ownership of VALE, in Sabará municipality. In the greenhouse, there were 20 legume plant species, which 11 plant species had nodules. They were smashed in petri dishes with 79 culture medium. The morphotypes obtained were isolated and culturally characterized. Afterward, a trial was performed to authenticate and evaluate the isolates' nitrogen fixing efficiency in symbiosis with Siratro (*Macroptilium atropurpureum*). The trial was carried out in tubes containing sand and vermiculite (1:1). The treatments were obtained with the isolates plus the control treatments without inoculation of the isolates (with high and low mineral nitrogen content) and with inoculation of the reference strains for Siratro in biological nitrogen fixation UFLA 04-0212 and SEMIA 656. The experimental design was completed randomized with three replicates, conducted for 45 days. After this period, the following parameters were measured: nodules number, nodule dry weight, shoot, root and total dry weight, and relative efficiency. The data were analysed by variance analysis using Scott-Knott test at 5% of probability. The genetic diversity was verified by the genomic DNA extraction and partial sequencing of the 16S rRNA gene. 92 isolates were obtained in pure culture, which 17 isolates shown fast growing acidifying the 79 medium, 12 isolates shown fast growing without changing the pH of the 79 medium, 10 isolates shown fast growing alkalizing the 79 medium, six isolates shown moderate growing acidifying the 79 medium, five isolates shown moderate growing without changing the pH of the 79 medium, seven isolates shown moderate growing alkalizing the 79 medium, one isolate shown slow growing without changing the pH of the 79 medium, and 33 isolates shown slow growing alkalizing the 79 medium. In the authentication and symbiotic efficiency trial, 90% of the isolates nodulated, but their relative efficiency were variable, and 10% of the isolates promoted an increase statistically higher than the control with high N content, showing high biological nitrogen fixation efficiency. From 92 isolates, 37 strains were sequenced, representing different culture groups, which were identified belonging to *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*,

Paenibacillus, *Lysinibacillus*, *Bosea*, *Cohnella* and *Leifsonia* genera. The results show a high genetic, phenotypic, and symbiotic diversity.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Cultural characterization. 16SrRNA sequencing. *Macropitium atropurpureum*. Restoration of degraded areas.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

- Figura 1 Distribuição dos 92 isolados de diferentes espécies de mudas de leguminosas, em nove tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).58
- Figura 2 Número de isolados de cada espécie das mudas de leguminosas, em tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).59
- Figura 3 Distribuição de todos os isolados obtidos de 11 espécies das leguminosas estudadas, com base nas características culturais avaliadas: pH, cor, forma, borda, EPS (Produção de exopolissacarídeo), CMC (Consistência da massa da colônia) e absorção de corante.....60

LISTA DE QUADRO E TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1	Características gerais das mudas de leguminosas	24
----------	---	----

SEGUNDA PARTE

Tabela 1	Características das espécies das mudas de leguminosas.....	50
Tabela 2	Análises químicas e físicas do substrato de cultivo das mudas	50
Tabela 3	Espécies vegetais e número de isolados	57
Tabela 4	Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), total (MST) e dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (EFR) obtidos em plantas de siratro, com inoculação de estirpes isoladas de diferentes mudas de leguminosas, dois controles positivos (Semia 656 e UFLA 04-212) e dois controles negativos (Alto (A/N) e baixo teor de nitrogênio mineral (B/N)) ⁽¹⁾	62
Tabela 5	Identificação de estirpes com base nas sequências do 16S rRNA mais similares encontradas no GenBank. Os isolados são oriundos de diferentes leguminosas.....	66
Tabela 6	Relatos anteriores de simbiose das espécies estudadas	73
Tabela 7	Hospedeiros de origem e espécies identificadas	74

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Atividade de mineração	17
2.2 Recuperação das áreas degradadas	19
2.3 Utilização de leguminosas na recuperação de áreas degradadas	22
2.4 Características gerais das mudas de leguminosas utilizadas neste estudo	23
2.5 <i>Macropitilium atropurpureum</i> (DC.) Urb.	26
2.6 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	27
2.7 Diversidade microbiana	30
REFERÊNCIAS	33
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	43
ARTIGO 1 Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro	44
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Área de estudo e coleta de nódulos de rizóbios	49
2.2 Isolamento e caracterização cultural	52
2.3 Autenticação dos isolados e eficiência simbiótica	53
2.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas	55
3 RESULTADOS	57
3.1 Isolamento e caracterização cultural	57
3.2 Autenticação e eficiência simbiótica dos isolados	61

3.3	Sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA	65
4	DISCUSSÃO.....	69
5	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS	83

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração e processamento de minérios são de grande importância socioeconômica, contribuindo para o bem estar e a melhoria de qualidade de vida, entretanto, é inevitável a alteração do meio ambiente (FOX et al., 1991; FRANCO et al., 1994).

Desde o final da década de 80 houve a criação de lei que obriga as empresas mineradoras a minimizarem os impactos causados ao meio ambiente, através da recomposição florística das áreas exploradas e afetadas (BRASIL, 1989)

A recuperação da vegetação natural de uma área impactada por metais pesados é lenta e incerta, a qual pode ser conseguida através da revegetação. O desenvolvimento da vegetação está relacionado à comunidade microbiana do solo que pode, entre diversos mecanismos, disponibilizar nutrientes para as plantas.

As bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) atmosférico (BFN) são microrganismos abundantes em solos de diferentes ecossistemas. Alguns gêneros de BFN são capazes de estabelecer simbiose com um grande número de espécies leguminosas, caracterizada pela formação de nódulos que são estruturas específicas formadas nas raízes e às vezes no caule de algumas espécies, como *Sesbania rostrata*. Nestes nódulos ocorre a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) pelas BFN forma assimilada pelas plantas, contribuindo para o desenvolvimento vegetal.

Essas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) são capazes de fornecer a quantidade de nitrogênio total ou parcial para o desenvolvimento dessas plantas, justificando a importância dos estudos envolvendo BFNNL em cultivos agrícolas e em programas de revegetação de solos degradados. As leguminosas, por incorporarem nitrogênio no sistema solo-

planta e apresentarem crescimento rápido contribuem com o maior aporte de material orgânico no solo, permitindo, assim, condições ideais para o restabelecimento da biota do solo.

Aliado a isso, alguns estudos demonstram que algumas BFN apresentam resistência a metais pesados (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; FERREIRA et al., 2013). Desta forma, a utilização de BFN capazes de estabelecer simbiose com leguminosas em áreas contaminadas com metais pesados é de grande importância para a recuperação desses ecossistemas. A introdução dessas BFNNL deve ocorrer através da inoculação de estirpes nodulíferas eficientes em mudas de leguminosas. Sendo estas capazes de se adaptarem e se desenvolverem nos diferentes tipos de solos. Por isso, torna-se importante que a BFN, além de estabelecer simbiose eficientemente com a leguminosa, seja capaz de tolerar as condições edafoclimáticas do ambiente.

Considerando a importância das BFNNL para o desenvolvimento das leguminosas, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade genotípica, fenotípica e simbiótica de bactérias nodulíferas que estabelecem simbioses radiculares com mudas de leguminosas pertencentes ao viveiro do CeBio (Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero), propriedade da VALE, visando a seleção de estirpes eficientes em estabelecer simbiose com leguminosas, com potencial de uso em reflorestamento de áreas degradadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Atividade de mineração

A mineração é um dos setores básicos da economia do país, contribui de forma decisiva para o bem-estar e a melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, pois, a partir da produção minerária criam-se empregos e insumos para a indústria em geral, sendo fundamental para o desenvolvimento da sociedade (FARIAS; GOMES, 2002).

O setor mineral, em 2012, gerou US\$ 82,3 bilhões de dólares e criou aproximadamente 193 mil empregos diretos (DNPM, 2013; IBGE, 2013). Os estados que mais produziram minérios em 2012 foram: Minas Gerais (53,2%), Pará (28,6%), Goiás (4,1%), São Paulo (2,8%), Bahia (2%) e outros (9,3%) e os minérios mais exportados foram nióbio, minério de ferro, manganês, tantalita, bauxita, entre outros (IBRAM, 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de nióbio, o 2º produtor de minério de ferro, o 3º de bauxita, o 6º de fosfato, o 12º de potássio, também são produzidos magnésita, ouro, vermiculita, estanho, cromo, níquel, entre outros (IBRAM, 2012).

A produção de nióbio em 2012 no Brasil foi de aproximadamente 82 mil toneladas, ou seja, 93,52% da produção mundial, e os principais estados produtores foram Minas Gerais (69%) e Goiás (30%) (DNMP, 2013)

A produção de minério de ferro em 2012 no Brasil foi de 400,8 milhões de toneladas, ou seja, 11,4% da produção mundial e os principais estados produtores foram Minas Gerais (69,2%), Pará (26,8%), Mato Grosso do Sul (2,2%) e Amapá (1,7%) (DNPM, 2013). Já a produção de bauxita foi de 33 milhões de toneladas, o que representa 12,7% da produção mundial (DNPM, 2013).

A produção de fosfato no Brasil foi de 6,7 milhões de toneladas, ou seja, 3,2% da produção mundial e a de potássio de 400 mil toneladas que representa aproximadamente 1% da produção mundial (DNPM, 2013).

O Brasil é um grande produtor de vários minérios, porém é dependente de alguns minérios estratégicos para a economia, importa 91% do potássio e 51% do fosfato, ambos essenciais para a indústria de fertilizantes e é o 4º maior consumidor de fertilizantes do mundo (IBRAM, 2012).

Todavia, esta atividade assim como toda exploração de recurso natural provoca impactos ao meio ambiente, seja com a exploração de áreas naturais ou mesmo na geração de resíduos. A poluição visual é um dos efeitos visíveis da mineração ao meio ambiente, grandes crateras, paredões e áreas devastadas são produtos da mineração (MECHI; SANCHES, 2010). Além disso, outros problemas ocorrem, tais como: poluição da água, do ar, sonora, impacto no solo e incêndios em decorrência do carvão e rejeitos radioativos (MME, 2002).

Em áreas degradadas pela mineração, além da retirada da vegetação natural, também ocorre uma intensa movimentação e retirada do solo no local de abertura da lavra, gerando um volume de solo estéril (MECHI; SANCHES, 2010).

Áreas vizinhas também são afetadas, sendo utilizadas como depósitos de estéril (substâncias minerais que não têm aproveitamento econômico) e de rejeito (rochas ou minerais inaproveitáveis presentes no minério e que são separadas deste, total ou parcialmente, durante o beneficiamento) (IBRAM, 1987).

Na área na qual o estudo foi realizado, CeBio, o ambiente foi morfológicamente modificado com alteração na paisagem em decorrência da abertura da lavra, de áreas com depósito de estéril e rejeitos, com abertura de estradas.

A intensidade da degradação depende do tipo de mineração, do volume de solo retirado e dos rejeitos produzidos, mas de forma geral essas áreas irão apresentar baixos teores de matéria orgânica, o que prejudica a estruturação do solo, torna a atividade biológica insuficiente e diminui a translocação de água e nutrientes às plantas, principalmente o nitrogênio e o fósforo (FRANCO et al., 1995).

Em alguns casos, como a extração em grandes jazidas, torna a reconstituição do ecossistema difícil, porém, através da condução adequada das operações de lavra e de um projeto de recuperação, a degradação ambiental pode ser minimizada.

2.2 Recuperação das áreas degradadas

A recuperação de áreas degradadas tem como objetivo restabelecer funções essenciais para proporcionar o equilíbrio e a sustentabilidade existente anteriormente no sistema natural (DIAS; GRIFFITH, 1988). De acordo com a Constituição Federal de 1998, artigo 225, estabelece que: “aquele que explorar recursos minerais fica obrigado a recuperar o meio ambiente degradado, de acordo com solução técnica exigida pelo órgão público competente, na forma de lei”.

O Decreto nº 97.632 de 10 de abril de 1989 estabelece a finalidade do Plano de Recuperação de Área Degradada (PRAD) pela mineração, onde: “A recuperação deverá ser um processo de reversão de tais áreas em terras produtivas e autossustentáveis, de acordo com uma proposta preestabelecida de uso do solo, podendo chegar ao nível de uma recuperação de processos biológicos – sendo assim chamada ‘reabilitação’ –, ou mesmo aproximar-se muito da estrutura ecológica original – restauração”.

A recuperação da vegetação natural é lenta e incerta devido a diversos fatores como os substratos possuírem características de baixa retenção de água, baixa fertilidade dos solos, condições desfavoráveis do solo, atividade biológica insuficiente ao crescimento vegetal e a falta de bancos de sementes (BARTH, 1989; IBAMA, 1990; PARROTTA; TURNBULL, 1997). Assim, uma estratégia que vem sendo empregada na recuperação destas áreas é a implantação de leguminosas associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), pois favorecem e aceleram o processo de sucessão vegetal (BROWN; LUGO, 1994) por contribuir com a biomassa e pela entrada de nitrogênio na área impactada.

Segundo Matias et al. (2009) ao avaliarem os benefícios de rizóbios e/ou fungos micorrízicos e microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de *Centrosema coriaceum* (Leguminosae) e *Tibouchina multiflora* (Melastomataceae) para recuperação de uma área de exploração de minério de ferro constataram que a leguminosa cobriu o solo mais rápido, resultando em um aumento de nitrogênio e fósforo na biomassa vegetal e melhoria na capacidade de retenção da água.

Melloni et al. (2006) ao avaliarem a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) em áreas reabilitadas com gramíneas, leguminosas herbáceas, bracatinga, espécies arbóreas nativas e eucalipto concluíram que a maior diversidade de BFNNL foi encontrada nas áreas revegetadas com as leguminosas bracatinga e feijão guandu.

Souza et al. (2012), ao avaliarem o potencial de *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Erythrina speciosa* e *Schizolobium parahyba*, leguminosas arbóreas nativas na fase de mudas para revegetação de áreas contaminadas com chumbo, encontraram que a espécie *M. caesalpiniaefolia* foi a única em que os parâmetros avaliados não apresentaram efeito aparente sob altas concentrações de chumbo. Já as outras duas espécies apresentaram reduções na produção de

biomassa e altura das plantas. As altas concentrações de chumbo no solo não afetaram estatisticamente o número de nódulos e peso seco de nódulos da *M. caesalpiniaefolia*, porém para *E. speciosa* houve redução estatisticamente significativa para o peso seco de nódulos. De acordo com os resultados, a espécie com potencial para a revegetação de solo contaminado com chumbo é a *Mimosa caesalpiniaefolia*.

No estudo de Ferreira et al. (2013) observou-se que a combinação de rizóbios, leguminosas e aplicação de silicato de cálcio podem auxiliar na recuperação de solos contaminados por metais pesados. Ao aplicar calcário e silicato de cálcio em solo contaminado com metal pesado ocorreu aumento significativo no pH do solo, com reduções na disponibilidade de cádmio e zinco. Além disso, a aplicação de silicato de cálcio aumentou a disponibilidade de fósforo, o número de nódulos, a taxa de fixação de nitrogênio e houve maior produção de matéria seca da parte aérea das leguminosas estudadas, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Mimosa pudica*.

As espécies vegetais utilizadas na recuperação de áreas degradadas podem ser provenientes de viveiro, sendo que estes apresentam condições ideais para o desenvolvimento de mudas, como: umidade, temperatura, luminosidade, proteção contra o vento e chuvas. Conhecer o comportamento dessas espécies em viveiro é fundamental para estabelecer o plantio em larga escala em áreas já desmatadas (MOREIRA, 1997).

A revegetação aliada a uma seleção adequada dessas espécies e das técnicas de manejo do solo deverá proporcionar a recuperação do ecossistema, de maneira a possibilitar o retorno da fauna, principalmente de dispersores e polinizadores responsáveis pela introdução de novas espécies na área.

2.3 Utilização de leguminosas na recuperação de áreas degradadas

As espécies leguminosas apresentam ampla distribuição geográfica, incluindo cerca de 20.000 espécies em aproximadamente 730 gêneros (LEWIS et al., 2005). Sendo composta por espécies de todos os tipos de hábito, como lianas, herbáceas, arbustos e árvores (FRANCO; RESENDE; CAMPELLO, 2003).

As leguminosas destacam-se por sua grande importância ecológica e econômica, estabelecem simbiose com BFN, são produtoras de óleos, resinas, sementes utilizadas na alimentação, madeiras que são muito valiosas, além de espécies que são exploradas como forrageiras (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Além disso, podem ser utilizadas na adubação verde, melhorando as propriedades do solo, auxiliando no controle de patógenos e de plantas invasoras e quando ocorre a fixação biológica de nitrogênio, contribui para o fornecimento de nitrogênio para outras culturas (ESPINDOLA; GUERRA; ALMEIDA, 2005).

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae (APG II, 2003). Vários gêneros de leguminosas têm sido estudados nesses últimos anos quanto à capacidade destas em fixar N_2 e, com isso, diversos gêneros nodulíferos e não nodulíferos têm sido identificados. De um modo geral, em torno de 23% de todas as espécies já foram estudadas quanto a esse respeito e 88% dos gêneros nodulam (FARIA et al., 1999). Papilionoideae é a que apresenta o maior número de espécies nodulíferas, seguida de Mimosoideae e Caesalpinoideae é a menos expressiva (BARBERI et al., 1998; FARIA; GUEDES, 1999; SPRENT, 2001).

O uso de espécies leguminosas apresenta benefícios, essa família se associa simbioticamente às bactérias fixadoras de nitrogênio e ocorre a incorporação de nitrogênio ao sistema solo-planta. Aliado a isso, apresenta

crescimento rápido e sistema radicular profundo, o qual confere maior ciclagem de nutrientes (FRANCO; RESENDE; CAMPELLO, 2003).

A capacidade de nodular e fixar o N₂ das leguminosas são fatores importantes devido à possibilidade da utilização destas no desenvolvimento de sistemas agroflorestais, recuperação de encostas degradadas e recuperação de áreas com exploração mineral (FRANCO et al., 1995; FARIA et al., 1998, 2002; VIEIRA; FEISTAUER; SILVA, 2003).

Para a leguminosa se beneficiar da fixação de N₂ devem-se considerar as comunidades nativas de BFN, pois a eficiência dessa simbiose depende das características da planta, da bactéria, do clima e do solo, além do grau de especificidade simbiótica entre a planta e a bactéria inoculada.

A simbiose com as BFN, sendo eficiente, apresenta a vantagem econômica de dispensar totalmente ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados industriais, pois a BFN vai disponibilizar nitrogênio às plantas, reduzindo os custos com esse insumo (MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

2.4 Características gerais das mudas de leguminosas utilizadas neste estudo

O viveiro de mudas do CeBio (Centro de Pesquisas e Conservação da Biodiversidade do Quadrilátero Ferrífero) pertencente à Mina de Córrego do Meio, Propriedade da VALE, localizada no município de Sabará, MG, está focado na reprodução de espécies arbóreas, arbustivas e produção de mudas de espécies dos campos rupestres, principalmente orquídeas e bromélias.

As mudas produzidas no CeBio são destinadas à implantação e manutenção de bancos de germoplasma, recuperação de áreas mineradas pela Vale e projetos desenvolvidos por outras instituições e organizações.

Quadro 1 Características gerais das mudas de leguminosas

Espécies	Subfamília	Distribuição em Minas Gerais	Nodulação	Aplicações	Referências
<i>Abarema brachystachya</i> (DC.) Barneby & J.W. Grimes	Mimosoideae	Domínio Atlântico	SI	Madeira é apreciada para diversos fins	Oliveira – Filho, 2006
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong.	Mimosoideae	Domínios Atlântico, Cerrado e Mata Seca	+	Árvore de rápido crescimento inicial pode ser utilizada para reflorestamento de áreas degradadas, juntamente com outras espécies	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006
<i>Enterolobium gummiferum</i> (Mart.) J.F. Macbr.	Mimosoideae	Domínios Atlântico e Cerrado	SI	Paisagismo; Construção civil; Goma da casca, as folhas e a seiva são reputadas como medicinais	Lorenzi, 2009; Oliveira – Filho, 2006
<i>Mimosa bimucronata</i> (DC.) Kuntze	Mimosoideae	Domínio Atlântico	+	Madeira utilizada na carpintaria, marcenaria; Cerca viva	Lorenzi, 2009; Oliveira – Filho, 2006
<i>Plathymenia reticulada</i> Benth.	Mimosoideae	Domínios Atlântico, Cerrado e Mata Seca	SI	Paisagismo; Madeira é própria para mobiliário de luxo; Construção civil	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006
<i>Centrolobium tomentosum</i> Guill. ex Benth	Papilionoideae	Domínios Atlântico e Cerrado	+	Recomposição de áreas degradadas em plantios mistos por ser pioneira e de rápido crescimento	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006

Continua...

Quadro 1 “conclusão”

Espécies	Subfamília	Distribuição em Minas Gerais	Nodulação	Aplicações	Referências
Dalbergia miscolobium Benth.	Papilionoideae	Domínios Atlântico e Cerrado	SI	Recomposição arbórea de áreas degradadas juntamente com outras espécies	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	Papilionoideae	Domínios Atlântico e Cerrado	+	Planta com caráter pioneiro, rústica e adaptada a terrenos secos, utilizada para plantios mistos em áreas degradadas de preservação	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006
<i>Machaerium nictitans</i> (Vell.) Benth.	Papilionoideae	Domínios Atlântico, Cerrado e Mata Seca	SI	A espécie é adequada para o plantio misto em áreas degradadas por ser rústica e adaptada à luz direta	Lorenzi, 2009; Oliveira – Filho, 2006
Ormosia arborea (Vell.) Harms	Papilionoideae	Domínios Atlântico e Cerrado	SI	A árvore pode ser utilizada juntamente com outras espécies para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006
Platypodium elegans Vogel	Papilionoideae	Domínios Atlântico, Cerrado e Mata Seca	+	Planta pioneira e rústica utilizada na recomposição de áreas degradadas	Lorenzi, 2008; Oliveira – Filho, 2006

SI: Sem informação de relatos de nodulação

2.5 *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb

O *Macroptilium atropurpureum* (siratro) é uma espécie originária do México e ocorre naturalmente em alguns países da América Central e do Sul. É uma leguminosa, perene, com raízes profundas, trepadeira herbácea (PUPO, 1979).

O siratro é uma leguminosa forrageira que pode ser utilizada na recuperação de pastagem devido a grande produção de matéria seca e elevada taxa de fixação de nitrogênio (MACHARIA et al., 2010). Também pode ser usado na adubação verde por ser adaptado às condições de baixa fertilidade do solo e por ser uma leguminosa perene, ou seja, mantém suas folhas durante o período de floração, formando uma cobertura permanente no solo (ESPINDOLA; GUERRA; ALMEIDA, 2005).

Em estudo realizado por Perin et al. (2009), para avaliar o efeito da cobertura viva formada por leguminosas perenes (amendoim forrageiro, cudzu tropical, siratro) e pela vegetação espontânea (gramínea) e vegetação espontânea + N (fertilizante), verificaram que todas as leguminosas proporcionaram aumento no crescimento das bananeiras em relação aos tratamentos com vegetação espontânea (com ou sem N fertilizante). O potencial benéfico das leguminosas cudzu tropical e siratro, como coberturas vivas, qualifica essas espécies como alternativas promissoras para fertilização do solo, adubação e nutrição das bananeiras.

A espécie *M. atropurpureum* é considerada uma hospedeira promíscua por estabelecer simbiose com bactérias nodulíferas em leguminosas de diferentes gêneros, como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (BROMFIELD; BARRAN, 1990; TRINICK; MILLER; HADOBAS, 1991), *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (FLORENTINO; MOREIRA, 2009; GONÇALVES; MOREIRA, 2004; MOREIRA et al., 2006) e as bactérias

da subclasse β – proteobactéria, *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; SILVA, 2009; CARVALHO, 2010) e *Cupriavidus* (SILVA et al., 2012).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), as espécies conhecidas de bactérias fixadoras de nitrogênio que estabelecem simbiose com *M. atropurpureum* são, *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1879, 1889), biovars phaseoli, trifolii, viceae (JORDAN, 1984), *Rhizobium giardinii* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997) biovars phaseoli, giardinii, *Rhizobium gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1984), *Bradyrhizobium canariense* (VINUESA et al., 2005), *Azorhizobium doebereineriae* (syn. *A. johannae*) (MOREIRA et al., 2006) e *Mesorhizobium loti* (JARVIS; BPANKHURST; PATEL, 1982; JARVIS et al., 1997; JORDAN, 1984), com as respectivas estirpes tipo: ATCC10004^T, H152^T, R602sp^T, ATCC10324^T, BTA-1^T, BR5401^T e NZP2213^T.

O siratro tem sido muito utilizado em estudos que objetivem a captura de bactérias nodulíferas em leguminosas, por ser uma leguminosa promíscua, de pequeno porte o que facilita a manipulação e por ter sementes viáveis por longos períodos (JESUS et al., 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; LIMA et al., 2009).

2.6 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, constituindo em torno de 78% do ar atmosférico, sendo essencial à sobrevivência e ao crescimento dos organismos. Representa um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura dos ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, entre outras moléculas (KIM; REES, 1994).

Apesar da abundância de N_2 na atmosfera, esse gás não é utilizado de forma direta pela maioria dos seres vivos. Apenas alguns organismos do grupo dos procariotos conseguem converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera (N_2) em amônia (NH_3), uma forma assimilável que pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células (DOBEREINER, 1984).

Estes organismos são denominados bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e o processo responsável pela incorporação de nitrogênio (N_2) à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio envolve uma série de etapas que começam com a adaptação da bactéria à sua leguminosa hospedeira e culminam na fixação do N_2 atmosférico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias é um evento dinâmico e para a ocorrência é necessária a troca de sinais moleculares, indicando o reconhecimento entre os simbioses. Em seguida ocorre a adesão à superfície vegetal, penetração e multiplicação no interior da planta (REIS; OLIVARES, 2006).

As bactérias nodulíferas migram em direção às raízes ou caule em decorrência dos flavonóides que são secretados pela planta, estes funcionam como sinalizadores para as bactérias que possuem a proteína NodD, a planta reconhece os fatores de Nod e inicia-se o encurvamento do pelo radicular e, posteriormente, a formação dos nódulos (SPAINK et al., 1991; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A penetração da bactéria pode ocorrer através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas ou através de injúrias e feridas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; OLIVARES, 2006).

Os nódulos são estruturas específicas onde ocorre a redução de N_2 a NH_3 , intermediada pelo complexo enzimático denominado nitrogenase. A

amônia é disponibilizada para a planta em contrapartida ao fornecimento de fotoassimilados para as bactérias (ALBINO; CAMPO, 2001).

As principais reações bioquímicas em plantas envolvem a presença do N, sendo um dos elementos absorvidos em maior quantidade pelas plantas cultivadas, esse se perde facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação, sendo necessário um manejo adequado da adubação tanto do ponto de vista econômico como ecológico e agrônômico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido ao alto custo da produção agrícola e aos problemas ambientais é importante recorrer ao processo de FBN, o qual contribui para a qualidade ambiental e outros processos biológicos do solo, além de reduzir o custo da atividade produtiva, por ser um processo natural, não poluente, por consumir energia da fotossíntese e ser manipulável e barato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O melhor exemplo de utilização do processo de FBN é o da inoculação de BNL do gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja, onde a adubação nitrogenada é totalmente substituída.

A simbiose das BFN com leguminosas são caracterizadas pela formação de nódulos, porém essas bactérias também podem ser de vida livre ou encontradas em associação com plantas de outras famílias, mas sem a formação de nódulos (ESPÍNDOLA; GUERRA; ALMEIDA, 1997).

As BFNNL são encontradas principalmente no filo α – Proteobacteria na Ordem Rhizobiales, nos seguintes gêneros *Rhizobium* (FRANK, 1889), *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1988; DE LAJUDIE et al., 1994), *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILIS, 1988), *Devosia* (RIVAS et al., 2002; 2003), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Methylobacterium* (SY et al., 2001, JOURAND et al., 2004), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005).

Chen et al. (2001) e Moulin et al. (2001) observaram que bactérias do filo β – Proteobacteria pertencentes à Ordem Burkholderiales identificadas como *Burkholderia sp.* e *Cupriavidus sp.* também são capazes de se associar com leguminosas.

Estirpes de BFNN e espécies leguminosas podem variar de altamente específicas a altamente promíscuas, ou seja, são capazes de estabelecer simbiose com poucos ou com vários parceiros. A promiscuidade do hospedeiro pode ser um fator limitante à fixação biológica de nitrogênio, já que algumas espécies nodulam com várias estirpes de BFN. Deste modo torna-se necessário a seleção de estirpes eficientes na FBN que possam competir pelos mesmos sítios de infecção com a comunidade nativa, que é muito diversa e às vezes pouco eficiente, e a inoculação deve conter elevado número de células para dar uma vantagem competitiva à população introduzida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em estudo realizado por Matsuda, Moreira e Siqueira (2002), verificou-se a tolerância de rizóbios ao cobre, cádmio e zinco, no qual demonstraram que estirpes de *Bradyrhizobium* procedentes de solos contaminados e isolados de hospedeiros de *Enterolobium* apresentaram alta tolerância a esses metais, ressaltando a importância dos estudos de seleção de estirpes.

A seleção de estirpes eficientes de BFN é de extrema importância, pois através dessas é possível produzir mudas com potencial de uso em áreas degradadas e de reflorestamento, com crescimento rápido e resistentes às condições de campo.

2.7 Diversidade microbiana

Os Microrganismos apresentam elevada diversidade genética, morfológica e desempenham funções cruciais nos ecossistemas como

componentes fundamentais das cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996).

A diversidade de microrganismos é muito vasta, porém grande parte destes é desconhecida. Estima-se que menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas tenham sido caracterizadas e descritas, dependendo do habitat estudado (STURSA et al., 2009).

A razão para o baixo número de espécies descritas é a dificuldade no cultivo destes microrganismos em condições laboratoriais, incluindo o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais (LIMA et al., 2009).

A biologia molecular tem contribuído significativamente para o avanço no conhecimento da diversidade microbiana, porém não dispensa o uso de dados fenotípicos e simbióticos. Dentre as análises fenotípicas, a caracterização cultural é primordial para a classificação de novos microrganismos e auxiliam nos estudos de diversidade (JESUS et al., 2005).

Com o advento das técnicas moleculares, o sequenciamento de genes que codificam para subunidades do RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para estudos de diversidade.

Os RNAs ribossomais são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofreram influência por mudanças no ambiente, sendo o gene 16S rRNA um dos mais utilizados para detectar as relações entre bactérias (WOESE, 1991).

O gene 16S rRNA pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da PCR sequenciado. Comparações entre as sequências de nucleotídeos do 16S rRNA têm sido utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (LIMA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Nos estudos de diversidade microbiana, a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), no polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), na amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), na análise do espaço ribossomal intergênico (RISA), na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), na eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e no polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) (KIRK et al., 2004)

Estudos que visem identificar a ocorrência, a diversidade e a eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas podem fornecer informações importantes sobre a ecologia destes micro-organismos.

REFERÊNCIAS

ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 527-534, 2001.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardini* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 4, p. 996-657, 1997.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

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

BARTH, R. C. Avaliação da recuperação de áreas mineradas no Brasil. **Boletim da Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa MG - Departamento de Engenharia Florestal/Universidade Federal de Viçosa, 41p. 1989.

BRASIL. **Decreto Federal nº 97.632**, de 10 de abril de 1989. Dispõe sobre a regulamentação do Artigo 2º, inciso VIII, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1980-1989/D97632.htm

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 369-372, 1990.

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

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanesis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, 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 Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 48, p. 1275-1284, 2013.

CARVALHO, F. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiontes radiculares em campos rupestres da serra do cipó-MG**. 2010. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov.; *Sinorhizobium saheli* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga*, sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, p. 715-733, 1994.

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, p. 1277-1290, 1998.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário Mineral**, 33 ed., 2013.

DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, Departamento de solos; Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, 1988, p. 1-7.

DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 83-90, 1984.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLS, 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, p. 89-98, 1988.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. **Adubação Verde**: Estratégia para uma Agricultura Sustentável. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1997.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Org.). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 435-451.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. **Recuperação de Solos Degradados com Leguminosas Noduladas e Micorrizadas**. Seropédica: EMBRAPA CNPAB, 1998. 23p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 77).

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 5, dez. 1999, p 1- 4.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, 1999, p. 667 – 686.

FARIA, S. M.; SILVA, M. G.; GRAIG, J.; DIAS, S. L.; LIMA, H. C.; NARA, M. Revegetação com espécies arbóreas fixadoras de nitrogênio em taludes de exploração de ferro na Samarco Minerações Mariana MG. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5., 2002, Água e biodiversidade. **Palestras**. Belo Horizonte: SOBRADE, 2002. p. 521-522.

FARIAS, C.; GOMES, E. **Mineração e meio ambiente**: relatório preparado para o CGEE. Porto Alegre, 2002.

FERREIRA, P. A. A.; BOMFETI, C. A.; SILVA JUNIOR, R.; SOARES, B. L.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 47, p. 85-95, 2012.

FERREIRA, P. A. A.; LOPES, G.; BOMFETI, C. A.; LONGATTI, S. M. O.; SOARES, C. R. F. S.; GUILHERME, L. R. G.; MOREIRA, F. M. S. Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 2055-2066, 2013.

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

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, p. 215-226, 2009.

FOX, R. L.; PENA, R. S. D. L.; GAVENDA, R. T.; HABTE, M.; HUE, N. V.; IKAWA, H.; JONES, R. C.; PLUCKNETT, D. L.; SILVA, J. A.; SOLTANPOUR, P. Amelioration, revegetation and subsequent soil formation in denuded bauxitic materials. **Allertonia**, v. 602, p. 128-184, 1991.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas - PA com leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas. In: SIMPÓSIO SULAMERICANO, 1.; SIMPÓSIO NACIONAL: RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 2., 1994, Foz do Iguaçu. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1994, p.679.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. **Oecologia Brasilienses**, v. 1, p. 459-467, 1995.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C. Importância das Leguminosas Arbóreas Nativas Recuperação de Áreas Degradadas e na Sustentabilidade de Sistemas Agroflorestais. In: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003.

FRANK, B. Ueber dies Parasiten in den Wurzeln – schwillungen der Papilionaceen. **Botanical Zeitung, Berlin**, v. 37, p. 376-387/ 394-399, 1879.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart v.7, p. 332-346, 1889.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. And its nodule isolates *Azorhizobium jonhannae* with other Legume Host and Rhizobia. **I Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology** (Print), v. 78, p. 6726-6733, 2012.

IGANCI, J. R. V.; MORIM, M. P. *Abarema* (Leguminosae, Mimosoideae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** (Impresso), v. 60, p. 581-594, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO - IBRAM. **Mineração e Meio Ambiente**. Belo Horizonte: IBRAM, 56p. 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO – IBRAM. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira**, 7 ed., 68 p. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Contas nacionais trimestrais**, 35p. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília, 95 p. 1990.

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

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET – MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer oh *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.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, London: Williams and Wilkins, v. 1, p. 234-244, 1984.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

KIM, J.; REES, D. C. **Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. Biochemistry**. v. 33, n. 2, p. 389 – 397, 1994.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. (Ed.) **Legumes of the world, Royal Botanic Gardens**, Kew, 577 p. 2005.

LIMA, A. S. **Densidade, eficiência, e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; 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 (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 320, p. 1-19, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, n. 5, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 2, n. 3, 2009.

MACHARIA, P. N.; KINYAMARIO, J. I.; EKAYAT, W. N.; GACHENE, C. K. K.; MUREITHI, J. G. Evaluation of forage legumes for introduction into natural pastures of semi-arid rangelands of Kenya. **Grass and Forage Science**, v. 65, p. 456-462, 2010.

MATIAS, S. R.; PAGANO, M. C.; MUZZI, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; CARNEIRO, A. A.; HORTA, S. N.; SCOTTI, M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 259-266, 2009.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 343-355, 2002.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos Ambientais da Mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, 2010.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. **Relatório perspectivas do meio ambiente para o Brasil: GEO-BRASIL**, 2002. Brasília: CPRM, março 2002. 31 p.

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

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

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; ROMERO, E. M.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta sub class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 21, p. 948-950, 2001.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das Árvores Nativas de Minas Gerais - Mapeamento e Inventário da Flora Nativa e dos Reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: Editora UFLA, v. 1. 423 p. 2006.

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

PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; ESPINDOLA, J. A. A.; TEIXEIRA, M. G.; BUSQUET, R. N. B. Desempenho de bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (UFLA), v. 33, p. 210-217, 2009.

PUPPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 343 p.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. **Embrapa Agrobiologia**. Documentos, n. 216, 34 p. 2006.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ – MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217-5222, 2002.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; KROPPENSTEDT, R. M.; MARTINEZ – MOLINA, E.; GILLIS, M.; VIZCAINO, N. 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**, v. 26, p. 47-53, 2003.

SILVA, K. **Identification and functional characterization of diazotrophic β -proteobacteria from brazilian soils**. 2009. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Syst Appl Microbiol**, v. 35, p. 175-82, 2012.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 236 p. 1988.

SOUZA, S. C. R.; ANDRADE, S. A. L.; SOUZA, L. A.; SCHIAVINATO, M. A. Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. **Journal of Environmental Management**, v. 10, p. 299-307, 2012.

SPAINK, H. P.; SHEELEY, D. M.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; GLUSHKA, J.; YORK, W. S. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. **Nature**, v. 354, p. 125-130, 1991.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.
STURSA, P.; UHLÍK, O.; KURZAWOVÁ, V.; KOUBEK, J.; IONESCU, M.; STROHALM, M.; LOVECKÁ, P.; MACEK, T.; MACKOVÁ, M. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. **Plant Soil and Environment**, Praha, v. 55, n. 9, p. 389-396, Sept. 2009.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y., NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN – MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylo-trophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, Jan. 2001.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 743-753, 2001.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A. Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.

TRUJÍLLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ – MOLINA, E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

VIEIRA, A. R. R.; FEISTAUER, D.; SILVA, V. P. Adaptação de espécies arbóreas nativas em um sistema agrossilvicultural, submetidas a extremos climáticos de geada na região de Florianópolis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 627-634, 2003.

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

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter1. The evolution of a science. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (Editors). **The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.** 2 ed. New York, 1991.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro

Juliana dos S. Costa; Rayssa P. Vicentin; Amanda A. Guimarães; Fatima M. S. Moreira

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica de bactérias presentes em nódulos de diferentes leguminosas. Para isto, a coleta dos nódulos foi realizada no viveiro pertencente à Mina de Córrego do Meio, Propriedade da VALE, no município de Sabará, MG. No viveiro havia 20 espécies de leguminosas, no entanto foram encontrados nódulos somente em 11. Os nódulos foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 e todos os morfotipos obtidos foram isolados e caracterizados culturalmente, posteriormente realizou-se experimento para autenticar e avaliar a eficiência desses isolados na fixação de nitrogênio em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*). O experimento foi realizado em tubetes contendo areia e vermiculita (1:1), sendo os controles, os tratamentos sem inoculação de estirpes (com alto e baixo teor de nitrogênio mineral) e com inoculação das estirpes de referência para siratro na fixação biológica de nitrogênio, UFLA 04-0212 e SEMIA 656. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições, conduzido por um período de 45 dias. Após este período foram avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos, matéria seca do nódulo, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca total e eficiência relativa. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para verificar a diversidade genética realizou-se a extração do DNA genômico e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram obtidos 92 isolados em cultura pura, destes 42,39% apresentaram crescimento rápido, 19,56% de crescimento intermediário, 38,04% de crescimento lento. Quanto à modificação do pH do meio de cultura, 26,08% acidificaram, 19,56% mantiveram o pH neutro e 54,34% alcalinizaram. No experimento de autenticação e eficiência simbiótica, 90% dos isolados nodularam, a eficiência relativa das estirpes autenticadas foi variável, sendo que 10% dos isolados promoveram aumento estatisticamente superior ao controle com alto teor de N, ou seja, apresentaram alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Das 92 estirpes isoladas foram sequenciadas 37, representantes dos diferentes grupos culturais as quais foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Bosea*, *Cohnella* e *Leifsonia*. Os resultados mostraram alta diversidade genética, fenotípica e simbiótica. Além disso, verificou-se que algumas das estirpes estudadas apresentaram alto potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Caracterização cultural. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. *Macroptilium atropurpureum*. Recuperação de áreas degradadas.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the genotypic, phenotypic, and symbiotic diversity of bacteria present in nodules of different legume plants. For this purpose, the nodules were collected in the greenhouse belonging to Mina de Córrego do Meio, ownership of VALE, in Sabará municipality. In the greenhouse, there were 20 legume plant species, which 12 plant species had nodules. They were smashed in petri dishes with 79 culture medium. The morphotypes obtained were isolated and cultural characterized. After wards a trial was performed to authenticate and evaluate the isolates nitrogen fixing efficiency in symbiosis with siratro (*Macroptilium atropurpureum*). The trial was carried out in tubes containing sand and vermiculite (1:1). The treatments were obtained with the isolates plus the controls treatments without inoculation of the isolates (with high and low mineral nitrogen content) and with inoculation of the reference strains for siratro in biological nitrogen fixation UFLA 04-0212 and SEMIA 656. The experimental design was completed randomized with three replicates, conducted for 45 days. After this period, the following parameters were measured: nodules number, nodule dry weight, shoot, root and total dry weight, and relative efficiency. The data were analysed by variance analysis using Scott-Knott test at 5% of probability. The genetic diversity was verified by the genomic DNA extraction and partial sequencing of the 16SrRNA gene. 92 isolates were obtained in pure culture, which 42,39% isolates shown fast growing, 19,56% shown moderate growing, 38,04% shown slow growing. Alteration of pH of the 79 medium, 26,08% acidified, 19,56% remained neutral pH e 54,34% alkalizing. In the authentication and symbiotic efficiency trial, 90% of the isolates nodulated, but their relative efficiency were variable, and 10% of the isolates promoted an increase statistically higher than the control with high N content, showing high biological nitrogen fixation efficiency. From 92 isolates, 37 strains were sequenced, representing different culture groups, which were identified belonging to *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Bosea*, *Cohnella* and *Leifsonia* genera. The results show a high genetic, phenotypic, and symbiotic diversity. Furthermore, it was found that some of the strains present great biotechnological potential.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Cultural characterization. 16SrRNA sequencing. *Macroptilium atropurpureum*. Restoration of degraded areas.

1 INTRODUÇÃO

A mineração é uma atividade de grande importância para a sociedade e para a economia brasileira, entretanto gera impactos no ambiente como poluição do ar, da água, do solo e sonora.

As áreas de mineração apresentam baixos teores de matéria orgânica, diminuindo a translocação de água e nutrientes às plantas, principalmente nitrogênio e fósforo e torna a atividade biológica insuficiente (FRANCO et al., 1995).

A recuperação dessas áreas dependerá, dentre outros fatores, de uma microbiota ativa em virtude de sua participação na ciclagem de nutrientes e nas mudanças físico-químicas necessárias para o crescimento das plantas.

As bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) atmosférico (BFN) são microrganismos abundantes em solos de diferentes ecossistemas. Alguns gêneros de BFN são capazes de estabelecer simbiose com um grande número de espécies leguminosas, caracterizada pela formação de nódulos, nestes ocorre a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), que será utilizada no metabolismo vegetal, contribuindo para o seu desenvolvimento.

Estudos com leguminosas florestais vêm sendo realizados em processos de restauração de solos degradados pela mineração devido ao fato destas obterem nitrogênio pela simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), contribuindo para o estabelecimento de ecossistemas florestais e acelerando a sucessão natural (FRANCO; FARIA, 1997).

A maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) pode maximizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em áreas degradadas devido ao fato destas poderem realizar a simbiose com várias espécies de leguminosas, aumentando a resiliência dos processos microbianos no solo (MELLONI et al., 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estudos de diversidade de bactérias nodulíferas em leguminosas têm utilizado plantas isca, que capturam populações de BFN de amostras de solo ou diretamente das raízes das plantas através da coleta de nódulos, este último demonstra a relação da diversidade de BFN com a diversidade de suas espécies hospedeiras (MOREIRA, 2008).

Para se ter acesso à diversidade, o isolamento e a caracterização cultural (cor, diâmetro das colônias, borda, forma, elevação, superfície, consistência da colônia, produção de exopolissacarídeos, absorção de corante) são primordiais para a classificação de novos microrganismos (JESUS et al., 2005), os gêneros de BFNNL podem ser diferenciados pela caracterização cultural em meio de cultura 79.

Guimarães et al. (2012), ao estudarem a diversidade genética e simbiótica de BFN isoladas de solos agrícolas da Amazônia Ocidental, utilizando feijão caupi (*Vigna unguiculata*) como planta isca, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Estes autores verificaram que as estirpes de crescimento intermediário e as de crescimento lento, que alcalinizaram ou mantiveram o pH neutro em meio 79 foram identificadas, predominantemente, como sendo do gênero *Bradyrhizobium* e apresentaram alta diversidade genética entre as estirpes. As características culturais observadas são típicas desse gênero, demonstrando que dados fenotípicos aliados às técnicas moleculares tornam a identificação de microrganismos mais completa e precisa.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica de bactérias presentes em nódulos de mudas de diferentes leguminosas. Além de verificar a eficiência simbiótica destas bactérias em siratro (*Macroptilium atropurpureum*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e coleta de nódulos de rizóbios

Este trabalho está vinculado ao projeto “Diversidade de plantas e de organismos do solo com potencial biotecnológico e indicadores de recuperação ambiental em Minas Gerais”.

A coleta de nódulos de mudas das leguminosas foi realizada em 9 de outubro de 2013, no viveiro pertencente à Mina de Córrego do Meio, Propriedade da VALE, localizada no município de Sabará, MG.

No viveiro estudado havia 20 espécies de leguminosas, dentre as nodulíferas foram encontrados nódulos nas raízes de 11 espécies leguminosas: *Abarema brachystachya* (5 nódulos), *Centrolobium tomentosum* (6 nódulos), *Dalbergia miscolobium* (5 nódulos), *Dalbergia nigra* (3 nódulos), *Enterolobium contortisiliquum* (7 nódulos), *Enterolobium gummiferum* (4 nódulos), *Machaerium nictitans* (5 nódulos), *Mimosa bimucronata* (5 nódulos), *Ormosia arborea* (5 nódulos), *Plathymenia foliolosa* (5 nódulos) e *Platypodium elegans* (6 nódulos), totalizando 57 nódulos (Tabela 1). Não foram encontrados nódulos nas raízes de *Dalbergia* sp., *Inga cylindrica*, *Inga vulpina* e *Mimosa pogocephala*. E havia cinco não nodulíferas: *Cassia ferruginea*, *Hymenaea courbaril*, *Senna macranthera*, *Senna multijuga*, *Schizolobium parahyba*.

Na coleta, sistemas radiculares das espécies de leguminosas foram retirados de sacos plásticos manualmente. Após a coleta, ainda no viveiro, os nódulos foram lavados em água corrente e armazenados em frascos de vidro com tampa rosqueável, contendo um chumaço de algodão e sílica gel, respectivamente, até a etapa de isolamento no Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Tabela 3 Características das espécies das mudas de leguminosas

Espécies	Subfamília	Hábito	Idade das mudas
<i>Abarema brachystachya</i>	Mimosoideae	Árvore	7 meses
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Papilionoideae	Árvore	5 meses
<i>Dalbergia nigra</i>	Papilionoideae	Árvore	10 meses
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Papilionoideae	Árvore	10 meses
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Mimosoideae	Árvore	7 meses
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Mimosoideae	Árvore	10 meses
<i>Machaerium nictitans</i>	Papilionoideae	Árvore	9 meses
<i>Mimosa bimucronata</i>	Mimosoideae	Árvore	8 meses
<i>Ormosia arborea</i>	Papilionoideae	Árvore	7 meses
<i>Plathymenia foliolosa</i>	Mimosoideae	Árvore	8 meses
<i>Platypodium elegans</i>	Papilionoideae	Árvore	11 meses

Foram retiradas amostras do substrato de cultivo das mudas após a retirada dos nódulos das raízes. Estas amostras foram submetidas a análises químicas e físicas efetuadas no Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. O substrato apresentava pH tendendo à neutralidade (6,5), à alta fertilidade indicada pelos valores das bases trocáveis e porcentagem da saturação de bases (79,85%) (Tabela 2).

Tabela 4 Análises químicas e físicas do substrato de cultivo das mudas

pH	K ⁺	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	V	m
	----- mg/dm ³ -----			----- cmol/dm ³ -----				----- dag/kg -----		----- % -----	
6,5	146	90,6	9,5	1,6	0	2,9	11,47	11,47	14,37	79,85	0
Alto	Muito Bom	Muito Bom	Muito Bom	Muito Bom	Muito Baixo	Médio	Muito Bom	Muito Bom	Bom	Bom	Muito Baixo
M.O	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	Argila	Silte	Areia	
dag/kg	mg/L	----- mg/dm ³ -----				----- dag/kg -----					
3,28	8,05	8,68	34,58	84,73	0,92	0,28	24,45	57	5	38	
Médio	Muito Bom	Muito Bom	Bom	Muito Bom	Médio	Baixo	Muito Bom				

Legenda:

pH em água; Ca – Mg – Al – Extrator: KCl – 1 mol/L

SB = Soma de bases trocáveis

CTC (T) – Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

m = Índice de Saturação de Alumínio

P-rem: Fósforo remanescente

Mat. Org. (MO) – Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N+H₂SO₄ 10N

S – Extrator – Fosfato monocálcio em ácido acético

P – Na – K – Fe – Zn – Mn – Cu – Extrator Mehlich 1

H + Al – Extrator : SMP

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

V = Índice de Saturação de Bases

B – Extrator água quente

2.2 Isolamento e caracterização cultural

Para o isolamento das bactérias foram utilizados os nódulos provenientes de cada espécie de leguminosa. Primeiramente, os nódulos foram lavados e hidratados em água destilada estéril, por trinta minutos. Após esse procedimento, os nódulos foram desinfestados superficialmente, sendo primeiramente imersos em álcool etílico 95% por 30 segundos, em seguida em H₂O₂ por três minutos e, após, lavados seis vezes em água destilada estéril. A cada desinfestação dos nódulos de plantas diferentes foram trocados todos os reagentes (álcool, H₂O₂ e água), sendo que a cada troca a água foi plaqueada para comprovar a eficácia do processo de desinfestação. Os nódulos foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) e o líquido obtido foi espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas.

Todos os morfotipos observados foram plaqueados para purificação, após esse processo os isolados foram estocados em tubo de ensaio com tampa rosqueável contendo meio 79 (sólido), mais óleo mineral em meio 79 (líquido), mais glicerol 20% e armazenado a 4°C. Além disso, foram mantidos em água destilada estéril, em temperatura ambiente.

Os isolados foram avaliados quanto às características culturais, como alteração do pH do meio de cultura após o crescimento da bactéria (ácido, neutro ou alcalino), taxa de crescimento avaliado pelo tempo de formação de colônias isoladas (1-3 dias, crescimento rápido; 4-5 dias, crescimento intermediário; 6-10, crescimento lento; mais de 10 dias, crescimento muito lento), alteração do pH do meio (acidificação, neutralização e alcalinização) conforme (MOREIRA, 1991), características das colônias: cor (creme, branca, amarela ou rosa), diâmetro das colônias (mm), borda (inteira, ondulada, filamentosa, lobada ou denteada), forma (circular, irregular ou puntiforme), elevação (plana, lente, convexa, drop-

like, umbilicada ou umbanada), superfície (lisa, rugosa ou papilosa) detalhes ópticos (transparente ou opaca), consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa, butírica ou viscosa), elasticidade, produção de exopolissacarídeos (escassa, pouca, moderada ou abundante) e absorção de corante (JESUS et al., 2005).

2.3 Autenticação dos isolados e eficiência simbiótica

Foram testados 90 isolados obtidos (dois não foram testados devido à obtenção tardia de colônias puras), contemplando 11 espécies de leguminosas estudadas. Esses foram autenticados em siratro (*Macropodium atropurpureum*) a fim de verificar sua capacidade nodulífera e sua eficiência para fixação biológica de nitrogênio nessa leguminosa.

O experimento foi conduzido de dezembro (2013) a fevereiro (2014) em casa de vegetação do Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno com capacidade volumétrica de 250 cm³ contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 1:1 (v:v) e adicionada solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) esterilizada, de acordo com a necessidade das plantas.

O experimento constituiu-se de três repetições, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com 94 tratamentos, sendo 90 isolados, dois controles negativos (um com teor de nitrogênio mineral (N) ideal para o desenvolvimento das plantas e outro com baixo teor de N, ambos sem inoculação) e dois controles positivos (com baixo teor de N mineral e inoculado com as estirpes referência para espécie vegetal em estudo, UFLA 04-212 e SEMIA 656).

Os dois controles negativos foram adicionados para comprovar a ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas. Nos tratamentos controle com baixo teor de N e nos inoculados, a solução nutritiva de Hoagland utilizada continha $5,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de N, a qual é considerada uma dose de arranque para o processo de fixação biológica de nitrogênio. As seguintes quantidades de solução estoque foram adicionadas em 4 L de água: 0,1 mL de $114 \text{ g.L}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,6 mL de $101,11 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$; 0,4 mL de $236,16 \text{ g.L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2 mL de $246,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3 mL de $87,13 \text{ g.L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$; 10 mL de $12,6 \text{ g.L}^{-1} \text{ Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 200 mL de $1,72 \text{ g.L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 mL FeEDTA e 1 mL de micronutrientes ($2,86 \text{ mg.L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $2,03 \text{ mg.L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,22 \text{ mg.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,09 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$).

No controle com teor de nitrogênio mineral (N) ideal para o desenvolvimento das plantas foi utilizada a solução de Hoagland e Arnon (1950) completa com $52,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrogênio.

A estirpe UFLA 04-0212, identificada como *Bradyrhizobium* sp. refere-se a um controle positivo de comprovada eficiência em estabelecer simbiose com o siratro (FLORENTINO et al., 2009) e a SEMIA 656 refere-se à estirpe recomendada como inoculante para siratro (*Macroptilium atropurpureum*) pela reunião de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE) e autorizada pelo MAPA, do gênero *Bradyrhizobium*.

Após o preparo dos tubetes com areia, vermiculita e papel alumínio, estes foram autoclavados por uma hora a 120°C . As sementes de siratro foram escarificadas e desinfestadas com ácido sulfúrico P.A por 20 minutos, lavadas sucessivamente em água destilada estéril e imersas em água destilada por duas horas. Posteriormente foram transferidas para a placa de Petri com algodão umedecido e incubadas a 28°C até a germinação. Duas sementes pré-germinadas

foram inseridas manualmente em cada tubete com auxílio de uma pinça estéril e após uma semana uma das plântulas foi desbastada.

Para a inoculação das plantas foi utilizado 1 mL de cultura crescida em meio de cultura 79 líquido sob agitação, por cerca de três a sete dias de acordo com a taxa de crescimento dos isolados.

O experimento foi conduzido por 45 dias, após esse período foram avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST) e eficiência relativa (EFR), que foi calculada segundo a fórmula $EFR = (MSPA \text{ inoculada}) * 100 / (MSPA \text{ da planta com N mineral})$. Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e as médias originais de NN e MSN sofreram transformações pela raiz quadrada ($x+1$).

2.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas

Das 92 estirpes isoladas foram selecionadas 37, representantes dos diferentes grupos culturais. O DNA genômico foi extraído pelo método de lise alcalina como descrito por Niemann et al. (1997), a partir de células de cultura pura, cultivadas de três a sete dias de acordo com a taxa de crescimento das estirpes em meio de cultura 79 (FRED; WAKSMAN, 1928). Para a amplificação do gene 16S rRNA foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). Alíquotas de 5 µL do *template* de DNA foram utilizadas para 50 µL de reação de PCR. O volume final dos reagentes por reação foram: 5 mL de tampão para PCR (10X), 2,5 µL dNTP

Mix (0,2 mM de cada), 5 μ L (2,5 mM) de $MgCl_2$, 2,5 μ L de cada *primer* (10 μ M), 0,2 μ L (5U μ L⁻¹) de *Taq* DNA Polimerase e água estéril ultra pura para completar o volume da reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler[®] nas seguintes condições: desnaturação inicial de 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°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coréia), para purificação e sequenciamento. A qualidade das sequências foram avaliadas com uso do programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA) e posteriormente foram submetidas ao programa BLASTn (Bethesda, MD, EUA) (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências similares depositadas no banco de dados do GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3 RESULTADOS

3.1 Isolamento e caracterização cultural

A partir dos nódulos das 11 espécies de leguminosas foram obtidos 92 isolados (Tabela 3).

Tabela 3 Espécies vegetais e número de isolados

Espécies	Nº nódulos	Nº isolados
<i>Abarema brachystachya</i>	5	7
<i>Centrolobium tomentosum</i>	6	15
<i>Dalbergia nigra</i>	3	2
<i>Dalbergia miscolobium</i>	5	7
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	7	18
<i>Enterolobium gummiferum</i>	4	6
<i>Machaerium nictitans</i>	5	15
<i>Mimosa bimucronata</i>	5	9
<i>Ormosia arborea</i>	5	1
<i>Plathymenia reticulada</i>	5	4
<i>Platypodium elegans</i>	6	8
Total	57	92

Dos 92 isolados, 42,39% apresentaram crescimento rápido, 19,56% crescimento intermediário, 38,04% crescimento lento. Quanto à modificação do pH do meio de cultura, 26,08% acidificaram, 19,56% mantiveram o pH neutro e 54,34% alcalinizaram. A distribuição desses isolados de acordo com seu tempo de crescimento e reação do indicador de pH do meio formaram nove tipos culturais (Figura 1), sendo que a espécie que apresentou maior diversidade cultural foi a *Enterolobium contortisiliquum* (Figura 2).

A maioria dos isolados alcalinizou o meio de cultura (54,34%), apresentou coloração creme, forma circular, borda inteira, pouca produção de exopolissacarídeo, consistência de massa gomosa e não absorveram indicador (Figura 3).

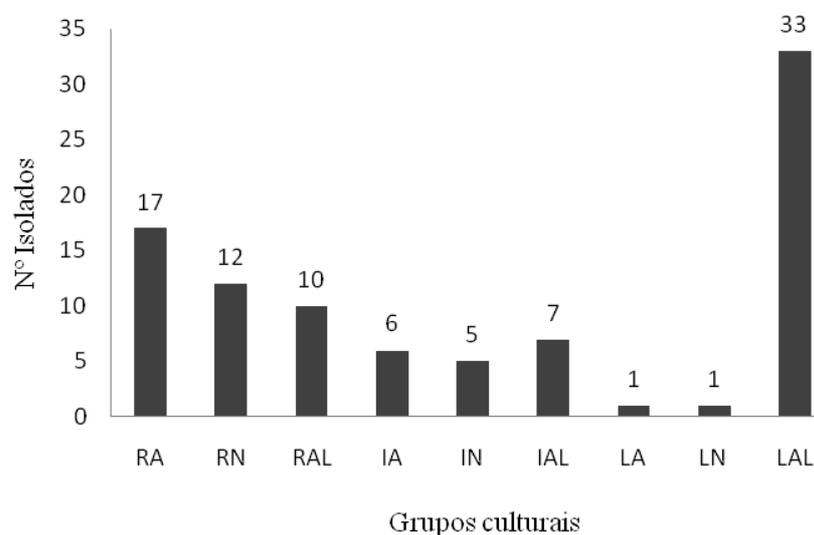


Figura 4 Distribuição dos 92 isolados de diferentes espécies de mudas de leguminosas, em nove tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).

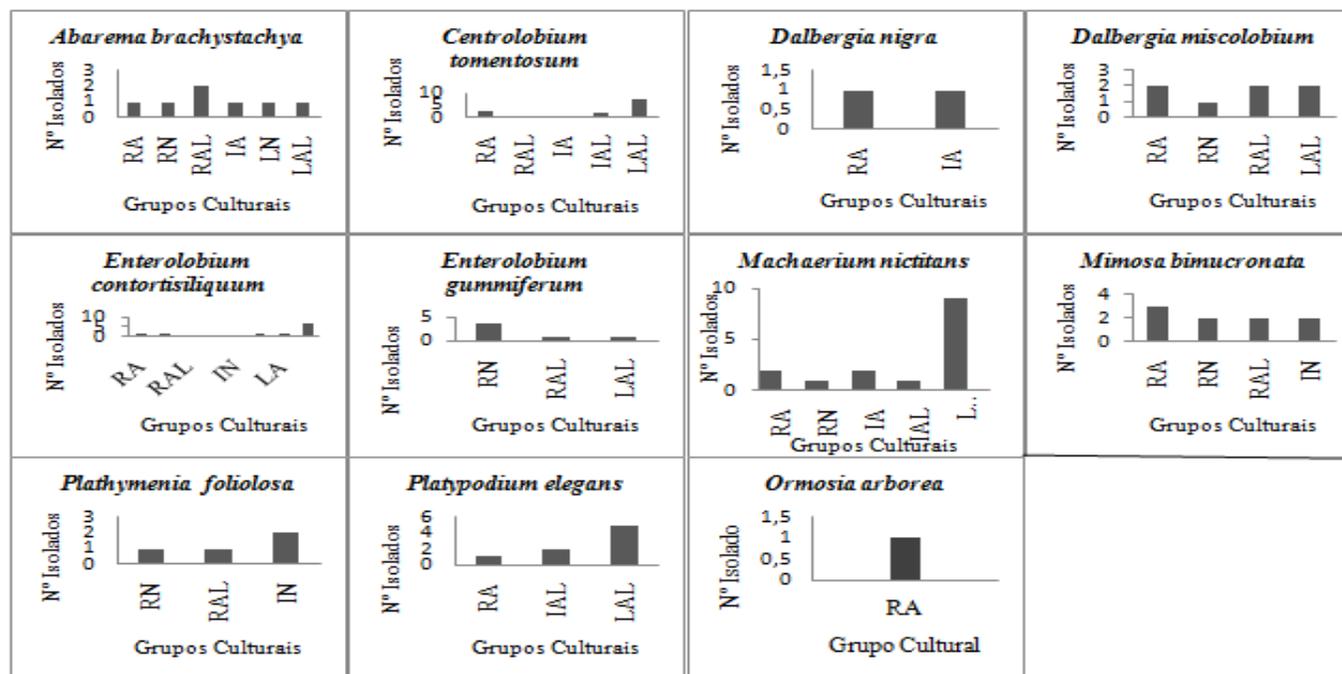


Figura 5 Número de isolados de cada espécie das mudas de leguminosas, em tipos culturais baseados no tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).

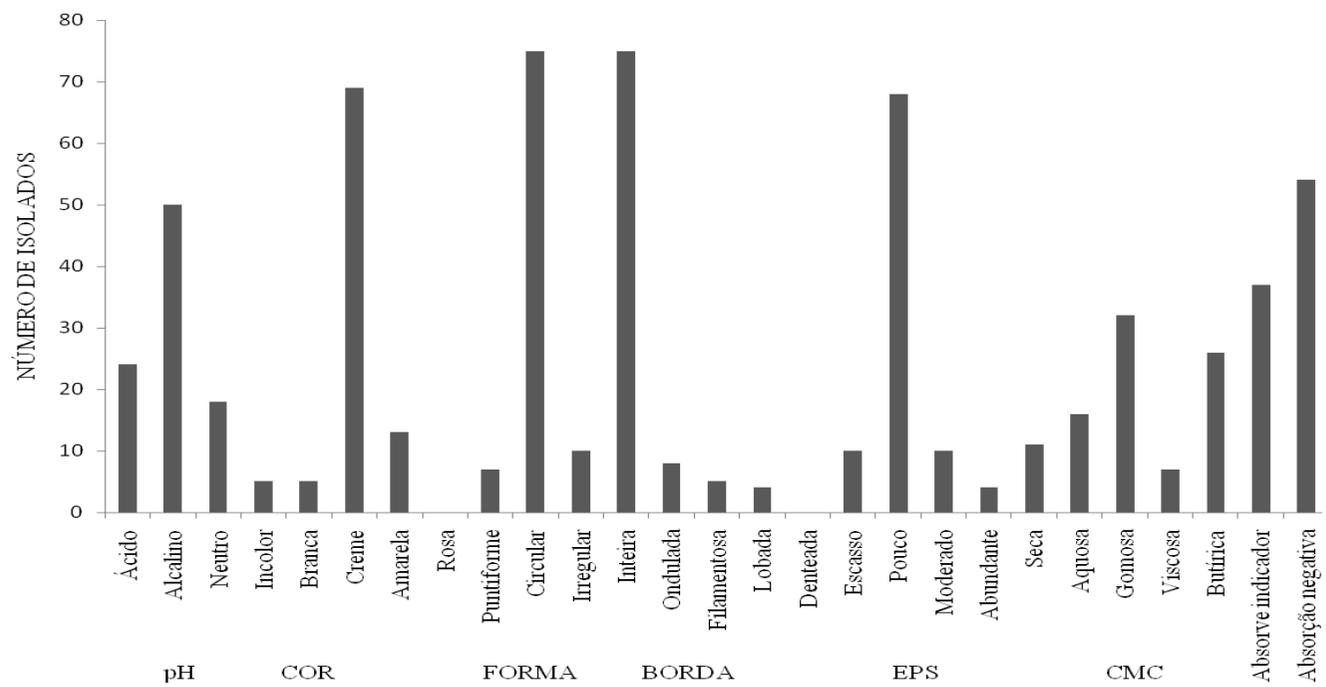


Figura 6 Distribuição de todos os isolados obtidos de 11 espécies das leguminosas estudadas, com base nas características culturais avaliadas: pH, cor, forma, borda, EPS (Produção de exopolissacarídeo), CMC (Consistência da massa da colônia) e absorção de corante.

3.2 Autenticação e eficiência simbiótica dos isolados

No experimento de autenticação, dos 90 isolados inoculados em tubetes, 81 apresentaram nodulação positiva e nove não nodularam. Dos isolados que não nodularam cinco apresentaram crescimento rápido, dois crescimento intermediário e dois crescimento lento.

No experimento de eficiência simbiótica, os controles sem inoculação e com baixo teor de N mineral não apresentaram nodulação, comprovando a ausência de contaminação. A análise de variância detectou efeito significativo dos tratamentos sobre matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), matéria seca de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (EFR %) (Tabela 4).

Os tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 01-831, UFLA 01-810, UFLA 01-809, UFLA 01-811, UFLA 01-818, UFLA 01-845, UFLA 01-834, UFLA 01-820 e UFLA 01-805 se destacaram por apresentar MSPA estatisticamente superior aos controles: com alto teor de N mineral e a estirpe de referência Semia 656. De modo geral, 39% das estirpes apresentaram alta eficiência na fixação biológica do nitrogênio e atuaram na promoção do crescimento de *Macrotium atropurpureum* (Tabela 4).

Na matéria seca da raiz os tratamentos que apresentaram as maiores médias foram UFLA 01-831, UFLA 810, UFLA 01-809, UFLA 01-811, UFLA 01-818, UFLA 01-845, UFLA 01-834, UFLA 01-836, UFLA 01-817, UFLA 01-808, UFLA 01-850 e UFLA 01-880 sendo estas estaticamente superiores à estirpe de referência Semia 656 e similares ao controle com alto teor de nitrogênio. Além disso, 19 estirpes apresentaram valores de MSR estatisticamente similares à estirpe de referência Semia 656 (Tabela 4).

Para matéria seca total, 12% das estirpes apresentaram valores significativamente similares ao tratamento controle com alto teor de N, 21%

obtiveram valores similares ao controle de referência Semia 656 e 67% apresentaram valores similares aos tratamentos controles, sem inoculação e com baixo teor de N mineral e a referência UFLA 04-0212 (Tabela 4).

Para a matéria seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN), foram observados dois grupos: um com o resultado semelhante aos tratamentos das estirpes de referência Semia 656 e UFLA 04-0212, nos quais as médias do NN variaram entre 29,33 e 110,33 e outro nos quais as médias variaram entre dois e 24 nódulos (Tabela 4).

A eficiência relativa (EFR) das estirpes variou de 16,41% na estirpe 88J a 148,61% na estirpe mais eficiente (UFLA 01-836), sendo a primeira considerada ineficiente por não diferir estatisticamente do controle sem inoculação e com baixo teor de N mineral (Tabela 4).

Tabela 4 Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), total (MST) e dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (EFR) obtidos em plantas de siratro, com inoculação de estirpes isoladas de diferentes mudas de leguminosas, dois controles positivos (Semia 656 e UFLA 04-212) e dois controles negativos (Alto (A/N) e baixo teor de nitrogênio mineral (B/N)) ⁽¹⁾.

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	MSN	NN	EFR (%)
	----- (mg por planta) -----					
A/N	562 b	283,00 a	845,00 a	0 b	0 b	100 b
B/ N	105 c	61,33 c	166,67 c	0 b	0 b	19,23 c
Semia 656	400 b	144,33 b	544,33 b	38 a	52,00 a	72,40 b
UFLA 04-212	221 c	86,67 c	307,67 c	30 a	75,00 a	39,44 c
UFLA 01-829	466 b	124,67 c	591,00 b	18 b	8,33 b	83,58 b
UFLA 01-827	436 b	142,33 b	578,67 b	31 a	11,67 b	75,23 b
UFLA 01-830	370 b	153,00 b	523,33 b	23 b	12,67 b	64,61 c
UFLA 01-831	665 a	191,33 a	856,33 a	49 a	21,67 b	122,15 a
UFLA 01-832	511 b	167,33 b	678, 67 b	29 a	24,00 b	92,02 b
UFLA 01-828	516 b	162,00 b	678,33 b	38 a	17,33 b	97,31 b
UFLA 01-857	274 c	130,00 c	404,00 c	18 b	16,67 b	50,96 c
UFLA 01-837	303 c	95,33 c	398, 67 c	32 a	47,00 a	54,06 c
9J	181 c	143,67 b	324,33 c	20 b	21,00 b	32,61c
10J	229 c	139,67 b	368, 67 c	0 b	0 b	40,73 c
UFLA 01-856	328 c	111,00 c	439,33 c	37 a	50,33 a	60,28 c

“continua”

Tabela 4 “continuação”

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	MSN	NN	EFR (%)
----- (mg por planta) -----						
UFLA 01-862	245 c	99,33 c	344,67 c	32 a	17,33 b	43,02 c
UFLA 01-826	542 b	179,00 b	721,00 b	46 a	38,67 a	101,91b
UFLA 01-881	307 c	98,67 c	405,67 c	46 a	35,33 a	53,16 c
UFLA 01-812	494 b	157,33 b	651,67 b	36 a	16,00 b	89,17 b
UFLA 01-858	249 c	143,33 b	392,67 c	0 b	0 b	44,95 c
UFLA 01-867	331 c	127,67 c	458,67 c	49 a	110,33a	59,35 c
UFLA 01-855	283 c	124,00 c	407,00 c	26 b	16,33 b	52,71 c
UFLA 01-836	591 b	209,00 a	800,00 a	53 a	15,00 b	148,61 a
UFLA 01-823	299 c	133,33 c	432,00 c	7 b	2,00 b	52,93 c
UFLA 01-851	408 b	105,33 c	513,33 c	51 a	65,67 a	73,68 b
UFLA 01-822	242 c	143,67 b	385,67 c	5 b	2,67 b	42,65 c
UFLA 01-841	271 c	84,00 c	355,33 c	36 a	45,00 a	49,07 c
UFLA 01-869	216 c	97,67 c	313,33 c	27 b	24,00 b	39,22 c
UFLA 01-875	142 c	72,33 c	214,00 c	26 b	29,33 a	25,99 c
UFLA 01-853	195 c	94,67 c	289,67 c	23 b	18,33 b	33,52 c
UFLA 01-868	145 c	91,33 c	236,67 c	17 b	17,33 b	26,33 c
UFLA 01-885	240 c	84,67 c	324,67 c	35 a	54,00 a	43,49 c
UFLA 01-859	213 c	135,33 c	348,00 c	32 a	29,33 a	36,69 c
UFLA 01-846	334 c	112,33 c	446,33 c	44 a	66,67 a	58,58 c
UFLA 01-819	558 b	144,33 b	702,67 b	52 a	64,00 a	99,99 b
UFLA 01-874	288 c	110,33 c	398,67 c	33 a	68,00 a	53,09 c
UFLA 01-806	267 c	126,00 c	393,33 c	0 b	0 b	48,12 c
UFLA 01-843	455 b	122,33 c	577,33 b	39 a	34,67 a	82,51 b
UFLA 01-810	780 a	210,67 a	990,33 a	50 a	74,67 a	141,16 a
UFLA 01-809	632 a	232,00 a	864,00 a	60 a	97,67 a	112,34 a
38J	203 c	121,33 c	324,67 c	29 a	40,00 a	36,27 c
UFLA 01-816	418 b	150,67 b	569,00 b	27 b	13,00 b	72,90 b
UFLA 01-805	684 a	161,67 b	845,33 a	49 a	69,00 a	119,95 a
UFLA 01-871	243 c	95,67 c	338,33 c	21 b	10,00 b	43,94 c
UFLA 01-860	391 b	88,33 c	479,67 c	36 a	50,33 a	72,77 b
UFLA 01-863	303 c	137,00 c	440,33 c	39 a	22,33 b	55,33 c
UFLA 01-883	318 c	116,67 c	435,00 c	34 a	85,00 a	55,91 c
UFLA 01-804	497 b	153,33 b	650,33 b	54 a	54,00 a	89,17 b
UFLA 01-814	381 b	136,67 c	517,33 c	16 b	9,67 b	64,73 c
UFLA 01-842	149 c	67,00 c	216,00 c	20 b	48,00 a	27,15 c
UFLA 01-870	155 c	98,00 c	253,00 c	0 b	0 b	27,58 c
UFLA 01-813	266 c	102,00 c	367,67 c	22 b	12,33 b	48,09 c
UFLA 01-872	205 c	88,33 c	293,67 c	25 b	56,00 a	36,77 c
UFLA 01-876	164 c	100,33 c	264,33 c	15 b	40,00 a	29,54 c
UFLA 01-820	581 a	175,67 b	756,67 b	52 a	29,33 a	105,43 b
UFLA 01-840	319 c	102,00 c	420,67 c	40 a	49,67 a	58,16 c
UFLA 01-839	198 c	111,00 c	308,67 c	32 a	47,67 a	36,95 c

“continua”

Tabela 4 “continuação”

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	MSN	NN	EFR (%)
----- (mg por planta) -----						
UFLA 01-873	409 b	121,00 c	530,33 b	35 a	58,67 a	71,19 c
UFLA 01-865	336 c	131,67 c	467,67 c	52 a	56,33 a	60,75 c
58J	257 c	109,33 c	366,67 c	32 a	57,67 a	47,55 c
UFLA 01-817	466 b	195,00 a	660,67 b	2 b	10,33 b	80,05 b
UFLA 01-811	760 a	217,67 a	977,67 a	63 a	69,33 a	136,66 a
UFLA 01-864	174 c	49,00 c	223,33 c	16 b	42,33 a	30,60 c
UFLA 01-835	375 b	92,67 c	468,00 c	33 a	41,67 a	65,83 c
UFLA 01-808	400 b	212,00 a	612,33 b	26 b	33,33 a	67,89 c
UFLA 01-833	148 c	90,67 c	238,33 c	21 b	53,67 a	26,82 c
UFLA 01-825	335 c	111,67 c	446,67 c	23 b	5,33 b	58,82 c
UFLA 01-818	707 a	239,00 a	946,00 a	47 a	55,67 a	127,25 a
UFLA 01-845	616 a	200,00 a	816,00 a	49 a	41,00 a	113,94 a
68J	184 c	102,33 c	286,33 c	19 b	62,00 a	34,39 c
UFLA 01-882	248 c	74,33 c	322,33 c	24 b	13,33 b	42,55 c
UFLA 01-821	422 b	150,00 b	572,33 b	23 b	11,33 b	80,19 b
UFLA 01-866	236 c	98,33 c	334,00 c	27 b	62,67 a	42,10 c
UFLA 01-847	351 c	120,67 c	472,00 c	50 a	62,67 a	62,66 c
UFLA 01-824	319 c	120,00 c	439,00 c	34 a	29,00 a	58,60 c
UFLA 01-854	231 c	88,67 c	319,33 c	27 b	61,67 a	42,91 c
UFLA 01-879	187 c	101,33 c	288,33 c	3 b	50,67 a	33,89 c
UFLA 01-815	365 c	109,33 c	474,00 c	32 a	20,67 b	64,68 c
UFLA 01-849	315 c	141,67 b	457,00 c	38 b	37,33 a	54,83 c
UFLA 01-838	228 c	145,33 b	373,33 c	16 b	9,00 b	41,27 c
UFLA 01-807	507 b	163,67 b	670,67 b	44 a	59,33 a	86,96 b
UFLA 01-852	342 c	130,67 c	473,00 c	55 a	49,00 a	62,06 c
UFLA 01-861	355 c	127,33 c	482,00 c	26 b	16,67 b	60,23 c
UFLA 01-877	126 c	88,33 c	214,67 c	0 b	0 b	22,93 c
UFLA 01-844	416 b	119,00 c	535,00 b	33 a	47,00 a	74,23 b
84J	133 c	76,33 c	209,33 c	0 b	0 b	24,44 c
UFLA 01-848	128 c	71,33 c	199,00 c	0 b	0 b	22,85 c
UFLA 01-850	440 b	196,00 a	636,33 b	35 a	66,33 a	75,50 b
87J	384 b	105,33 c	489,33 c	23 b	10,33 b	66,03 c
88J	88 c	48,00 c	136,33 c	0 b	0 b	16,41 c
UFLA 01-878	133 c	96,33 c	229,33 c	0 b	0 b	23,63 c
UFLA 01-884	476 b	111,00 c	587,00 b	51 a	30 b	84,50 b
UFLA 01-834	718 a	199,00 a	917,33 a	49 a	65,67 a	129,00 a
UFLA 01-880	410 b	186,33 a	596,33 b	17 b	15,67 b	79,14 b
CV (%)	48,41	34,38	43,26	1	38,56	50,76

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.3 Sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA

Das 92 estirpes isoladas foram sequenciadas 37, representantes de seis grupos culturais (RA, RAL, RN, IA, LAL, LA).

As seqüências obtidas variaram de 318 a 1028 pb, mostrando uma porcentagem de identidade de 98% a 100% com isolados já estudados (Tabela 5).

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA identificou as estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, sendo este o mais encontrado com treze estirpes, seguidos dos gêneros *Rhizobium* com oito estirpes, *Burkholderia* e *Bacillus* com três estirpes, *Bosea* e *Paenibacillus* com duas estirpes, *Lysinibacillus* e *Leifsonia* com uma estirpe. E entre as estirpes não nodulíferas estão os gêneros *Bradyrhizobium*, *Cohnella* e *Paenibacillus* (Tabela 5).

Entre as estirpes identificadas como *Bradyrhizobium*, a UFLA 01-805, UFLA 01-809, UFLA 01-811 e UFLA 01-834 apresentaram maior eficiência relativa na fixação de nitrogênio, com os seguintes valores: 119,95%; 112,34%; 136,66%; 129%, respectivamente, sendo estes estatisticamente superiores ao controle com alto teor de N mineral.

Tabela 5 Identificação de estirpes com base nas seqüências do 16S rRNA mais similares encontradas no GenBank. Os isolados são oriundos de diferentes leguminosas

Hospedeiros de origem	Códigos ⁽¹⁾ isolados	Estirpe	Nodulação ⁽²⁾	EFR ⁽³⁾ (%)	Grupos culturais	NPB	Seqüência mais similar encontrada no GenBank		
							Espécie	Si (%)	Código de Acesso
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 3.2	UFLA 01-829	+	83,58	RA	709	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KC189948.1
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Dm 2.1	UFLA 01-827	+	75,23	RA	620	<i>Burkholderia</i> sp.	99	JQ316419.1
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Dm 4.2	UFLA 01-830	+	64,61	RA	490	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF571875.1
<i>Mimosa bimucronata</i>	Mb 4.3	UFLA 01-858	-	44,95	RA	658	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	DQ365577.1
<i>Abarema brachystachya</i>	Ab 5.1	UFLA 01-855	+	52,71	RA	824	<i>Rhizobium</i> sp.	99	GU433459.1
<i>Ormosia arborea</i>	Oa 4.1	UFLA 01-823	+	52,93	RA	655	<i>Rhizobium</i> sp.	100	AB456618.1
<i>Abarema brachystachya</i>	Ab 5.2	24J			RA	672	<i>Bosea</i> sp.	100	JX566529.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 2.1	UFLA 01-861	+	60,23	RA	730	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	JF768727.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 5.1	UFLA 01-877	-	22,93	RA	318	<i>Cohnella</i> sp.	98	GU181266.2
<i>Dalbergia nigra</i>	Dn 3.2	UFLA 01-884	+	84,50	RA	522	<i>Leifsonia</i> sp.	100	AB730539.1
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Eg 1.1	UFLA 01-832	+	92,02	RN	843	<i>Rhizobium</i> sp.	99	GU433459.1
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Eg 4.3	UFLA 01-828	+	97,31	RN	1025	<i>Rhizobium</i> sp.	100	JX855180.1
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Eg 4.2	UFLA 01-857	+	50,96	RN	339	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KF053325.1
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Eg 1.2	UFLA 01-837	+	54,06	RN	740	<i>Rhizobium</i> sp.	99	HQ231924.1

“continua”

Tabela 5 “continuação”

Hospedeiros de origem	Códigos ⁽¹⁾ isolados	Estirpe	Nodulação ⁽²⁾	EFR ⁽³⁾ (%)	Grupos culturais	NPB	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
							Espécie	Si (%)	Código de Acesso
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Dm 2.2	UFLA 01-826	+	101,91	RN	854	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AY773190.1
<i>Mimosa bimucronata</i>	Mb 4.2	UFLA 01-867	+	59,35	RN	994	<i>Bacillus</i> sp.	99	KC236700.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 4.1	UFLA 01-817	+	80,05	RN	719	<i>Bacillus</i> sp.	100	KJ545711.1
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Dm 4.1	UFLA 01-831	+	122,15	RAL	730	<i>Burkholderia</i> sp.	100	JQ316419.1
<i>Abarema brachystachya</i>	Ab 2.1	UFLA 01-841	+	49,07	RAL	1028	<i>Bosea</i> sp.	99	HQ260890.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 6.1	UFL A 01-865	+	60,75	RAL	698	<i>Lysinibacillus</i> sp.	100	KF151163.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 4.2	UFLA 01-868	+	26,33	IA	827	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JX855182.1
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Ec 4.3	48J			LA	741	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	AY556412.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 4.1	UFLA 01-885	+	43,49	LAL	740	<i>Bacillus</i> sp.	99	AJ438301.1
<i>Platypodium elegans</i>	Pe 5.1	UFLA 01-874	+	53,09	LAL	758	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	AJ431635.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 3.2	UFLA 01-809	+	112,34	LAL	954	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	AB513458.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 1.1	UFLA 01-816	+	72,90	LAL	665	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JX284229.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 5.2	UFLA 01-805	+	119,95	LAL	664	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	GU433446.1
<i>Abarema brachystachya</i>	Ab 5.3	UFLA 01-871	+	43,94	LAL	720	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JX284227.1

“continua”

Tabela 5 “conclusão”

Hospedeiros de origem	Códigos ⁽¹⁾ isolados	Estirpe	Nodulação ⁽²⁾	EFR ⁽³⁾ (%)	Grupos culturais	NPB	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
							Espécie	Si (%)	Código de Acesso
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 2.1	UFLA 01-860	+	72,77	LAL	642	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	GU433446.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 4.3	UFLA 01-883	+	55,91	LAL	582	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JX284238.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 2.4	UFLA 01-814	+	64,73	LAL	786	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JN085505.1
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Dm 3.1	UFLA 01-870	-	27,58	LAL	830	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FR753091.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 5.2	UFLA 01-839	+	36,95	LAL	711	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF311071.1
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Ec 5.1	UFLA 01-873	+	71,19	LAL	604	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JX284238.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 2.3	UFLA 01-811	+	136,66	LAL	686	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KC113622.1
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Ct 4.2	UFLA 01-815	+	64,68	LAL	573	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KC113622.1
<i>Machaerium nictitans</i>	Mn 2.4	UFLA 01-834	+	129,00	LAL	609	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JX284238.1

⁽¹⁾ Códigos dos Isolados: Sigla alfabética correspondente ao hospedeiro de origem, o primeiro número se refere ao nódulo utilizado para o isolamento e o segundo número se refere à estirpe.

⁽²⁾ Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de siratro; sinal negativo (-): ausência de nódulos nas plantas de siratro

⁽³⁾ EFR: eficiência relativa obtida em plantas de siratro.

⁽⁴⁾ Características culturais no meio 79: (RA) tempo de crescimento rápido com acidificação do meio, (RN) tempo de crescimento rápido sem alteração do pH do meio, (RAL) tempo de crescimento rápido alcalinizando o meio, (IA) tempo de crescimento intermediário acidificando o meio, (LA) tempo de crescimento lento acidificando e (LAL) tempo de crescimento lento alcalinizando o meio; NPB: número de pares de bases; SI (%): percentagem de similaridade no GenBank.

4 DISCUSSÃO

O siratro (*Macropitilium atropurpureum*) estabeleceu simbiose com a maioria das estirpes isoladas, confirmando ser uma leguminosa promíscua. Os resultados deste estudo através da alta diversidade genética, fenotípica e simbiótica entre as estirpes estudadas concordam com o de outros autores que verificaram a promiscuidade desta espécie vegetal (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

Tais resultados corroboram os encontrados por Jesus et al. (2005) que verificaram alta diversidade cultural em solo, sob três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental, usando siratro como planta isca. Foram obtidos 257 isolados, os quais formaram cinco tipos culturais, variando de crescimento muito rápido a muito lento e que acidificaram, alcalinizaram e não alteraram o pH do meio.

Florentino et al. (2009) obtiveram diferentes tipos culturais de BFNNL, ao avaliarem a ocorrência de *Azorhizobium doebereineriae* e de outras BFNNL em amostras de solo utilizando *Sesbania virgata* e leguminosas promíscuas como leucena, siratro, feijão e feijão caupi. Siratro foi a espécie mais promíscua, seguida por feijão caupi, feijão, leucena e sesbania, as duas últimas capturaram o mesmo número de tipos culturais.

Do total de 81 isolados com capacidade de estabelecer simbiose com siratro, 16,04% apresentaram crescimento rápido com acidificação do meio e 13,25% apresentaram crescimento rápido e reação neutra. Esses dois grupos apresentaram estirpes pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e ainda estirpes do gênero *Burkholderia* no primeiro grupo. Os 38,27% de crescimento lento e reação alcalina do pH do meio pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*.

O fato de nove isolados não terem nodulado siratro não significa que não possuam a capacidade de nodulação, já que não foram inoculadas nas espécies

das quais foram isoladas, o que poderia indicar uma especificidade dessas bactérias com seu hospedeiro de origem (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A estirpe de referência UFLA 04-0212 demonstrou baixa eficiência relativa, sendo estatisticamente similar ao controle sem inoculação e com um baixo teor de N mineral. O fato da estirpe não ter apresentado bom desenvolvimento neste experimento pode estar relacionado às altas temperaturas diárias registradas no período em que o experimento foi instalado.

Durante o período em que o experimento foi instalado a temperatura externa da estufa foi de aproximadamente 31° C, indicando que a temperatura interior foi ainda mais elevada. As altas temperaturas podem ter afetado a infecção de alguns isolados, com isso pode-se inferir que os isolados que nodularam são tolerantes à alta temperatura, sendo este um fator positivo, já que um dos critérios nos estágios de seleção de estirpes é que sejam competitivas em condições de estresse.

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA identificou 37 estirpes, sendo estas pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bosea*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Leifsonia* e *Cohnella*.

Guimarães et al. (2012) ao estudar a diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos agrícolas, utilizando feijão caupi como planta isca, obtiveram no sequenciamento do gene 16S rRNA que o gênero *Bradyrhizobium* foi predominante, além de identificarem bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Achromobacter*.

A identificação de estirpes pertencentes aos filos α e β Proteobacteria, provenientes de nódulos de siratro e feijão caupi tem sido relatada em vários trabalhos, (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013; LIMA et al., 2009).

Diversos trabalhos têm identificado a simbiose efetiva de várias espécies de Mimosa com o gênero *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2010; CHEN et al., 2005; 2007), entretanto, neste estudo foi observada a incidência deste gênero em

nódulo da espécie vegetal *Dalbergia miscolobium* em que foi realizado o isolamento.

Rasolomampianina et al. (2005) ao estudarem 68 isolados oriundos de oito espécies de *Dalbergia* no sequenciamento do gene 16S rRNA identificaram os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus*.

O gênero *Burkholderia* tem sido identificado em vários estudos que utilizaram feijão caupi e siratro como planta isca (ANGUS et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012; LIMA et al., 2009; MOULIN et al., 2001; OLIVEIRA LONGATII; MARRA, 2014). Essas bactérias podem atuar na promoção do crescimento vegetal por processos como a FBN e solubilização de fosfato inorgânico (ANGUS et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* geralmente são endofíticos de nódulos, no entanto há relatos da nodulação em feijão caupi e siratro por esses gêneros (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013; LI et al., 2008; MARRA et al., 2012; OLIVEIRA-LONGATTI; MARRA, 2014; SILVA et al., 2012) e diversos trabalhos descrevem esses gêneros como promotores de crescimento de plantas (MARRA et al., 2012; PEDRINHO et al., 2010).

Costa et al. (2013) ao avaliarem o potencial de crescimento vegetal e a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão caupi, identificaram no sequenciamento do gene 16S rRNA estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*. Sendo que as estirpes do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* atuaram na promoção do crescimento de feijão caupi, através da produção auxina e solubilização do fosfato.

O gênero *Lysinibacillus* geralmente é endofítico de nódulos, em estudo realizado, Andrade et al. (2014) constataram que *Lysinibacillus* foi capaz de solubilizar fosfato de cálcio e produzir AIA (ácido indolacético) em meio de

cultura, demonstrando o potencial de uso desse gênero como promotor de crescimento para banana.

O gênero *Bosea* e a espécie *Bosea thiooxidans* foram descritos por Das et al. (1996) a partir de um isolado de solo agrícola, o gênero pertence à família Bradyrhizobiaceae. Esse gênero também foi encontrado no trabalho de Jaramillo et al. (2013), no qual se avaliou a diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos da planta isca feijão caupi de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental.

O gênero *Cohnella* foi descrito pela primeira vez por Kampfer et al. (2006), isolado a partir de amostra de amido de uma indústria, esse gênero pertence à família Paenibacillaceae. O primeiro relato da associação da bactéria do gênero *Cohnella* com uma leguminosa foi realizado por García-Fraile et al. (2008) no qual isolaram a bactéria a partir de nódulos de feijão-da-espanha.

O gênero encontrado com maior frequência foi *Bradyrhizobium*, corroborando com trabalhos que isolaram estirpes de nódulos de leguminosas florestais na Amazônia (MOREIRA et al., 1993; MOREIRA, 1997). A espécie vegetal com a maior diversidade genética foi *Dalbergia miscolobium* que estabeleceu simbiose com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e *Rhizobium*. Na tabela 6 constam as espécies vegetais das quais os nódulos foram provenientes e na tabela 7 relatos anteriores de simbiose das espécies estudadas.

Tabela 6 Relatos anteriores de simbiose das espécies estudadas

Espécies de leguminosas	Identificação do microssimbionte	Designação original	Referências da simbiose e identificação do microssimbionte
<i>Centrolobium tomentosum</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	-	Moreira; Haukka; Young, 1998
<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	BR 8402 ^R	Faria, 1997; Faria; Guedes, 1999; Faria; Mello, 1998;
<i>Enterolobium</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	BR 8404 ^R	Moreira et al., 1993; Moreira; Haukka; Youg, 1998
<i>contortisiliquum</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	BR 4406 ^R	Faria, 1997; Faria; Guedes, 1999; Faria; Mello, 1998;
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	BR 4407 ^R	Moreira et al., 1993; Moreira; Haukka; Young, 1998
<i>Mimosa bimucronata</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	BR 3460	Chen et al., 2007; Faria, 1997
	<i>Burkholderia nodosa</i>	BR 3461	
<i>Platypodium elegans</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	-	Parker, 2008

^R: estirpes recomendadas para espécies arbóreas

Tabela 7 Hospedeiros de origem e espécies identificadas

Hospedeiro de origem	Espécie	Hospedeiro de origem	Espécie
<i>Abarema brachystachya</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrolobium tomentosum</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.
<i>Centrolobium tomentosum</i>	"	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	"
<i>Dalbergia miscolobium</i>	"	<i>Machaerium nictitans</i>	"
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	"	<i>Machaerium nictitans</i>	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Machaerium nictitans</i>	"	<i>Mimosa bimucronata</i>	"
<i>Platypodium elegans</i>	"	<i>Dalbergia miscolobium</i>	<i>Burkholderia</i> sp.
<i>Abarema brachystachya</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Abarema brachystachya</i>	<i>Bosea</i> sp.
<i>Dalbergia miscolobium</i>	"	<i>Centrolobium tomentosum</i>	<i>Cohnella</i> sp.
<i>Enterolobium gummiferum</i>	"	<i>Centrolobium tomentosum</i>	<i>Lysinibacillus</i> sp.
<i>Machaerium nictitans</i>	"	<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Leifsonia</i> sp.
<i>Ormosia arborea</i>	"		

O estudo da diversidade das BFNNL é de grande importância, uma vez que os isolados obtidos podem apresentar potencial para serem utilizados como inoculantes em leguminosas nativas para fins de recuperação de áreas degradadas. Além disso, este estudo demonstrou a simbiose entre as espécies *Abarema brachystachya*, *Dalbergia miscolobium*, *Enterolobium gummiferum*, *Machaerium nictitans*, *Ormosia arborea* e *Plathymenia foliolosa* com BFNNL, não relatados na literatura, anteriormente.

A considerável diversidade fenotípica, genética e simbiótica encontrada nos isolados das mudas de viveiro, aliada à alta eficiência relativa apresentada por tais estirpes em simbiose com siratro, nos indicam que estas apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes, sendo necessários mais estudos para avaliar a simbiose das estirpes com leguminosas utilizadas em revegetação de áreas impactadas pela atividade de mineração.

5 CONCLUSÃO

A diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica das bactérias isoladas dos nódulos das mudas de leguminosas, coletadas no viveiro, foi alta.

Algumas estirpes (UFLA 01-831, UFLA 01-836, UFLA 01-810, UFLA 01-809, UFLA 01-805, UFLA 01-811, UFLA 01-818, UFLA 01-845 e UFLA 01-834) apresentam potencial de uso como inoculante para siratro, por apresentarem alta eficiência relativa, quando comparadas com tratamentos inoculados com estirpes de referência ou com alto teor de nitrogênio em solução nutritiva.

O gênero *Bradyrhizobium* é de extrema importância em estudos de seleção de estirpes para uso em inoculante, apresentando maior incidência nas espécies utilizadas e alta eficiência relativa (UFLA 01-809, UFLA 01-805, UFLA 01-811 e UFLA 01-834).

Este estudo contribuiu significativamente para o conhecimento da diversidade de BFNNL e para os primeiros passos para o desenvolvimento de novas pesquisas que têm por objetivo avaliar a potencialidade destes isolados para uso como inoculantes nas leguminosas de origem *Abarema brachystachya*, *Dalbergia miscolobium*, *Enterolobium gummiferum*, *Machaerium nictitans*, *Ormosia arborea* e *Plathymenia foliolosa*, promovendo a seleção de estirpes adaptadas para a recuperação de áreas degradadas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology** (Seoul. Print), v. 52, p. 27-34, 2014.
- ANGUS, A. A.; LEE, A.; LUM, M. R. L.; HIRSCH, A. M. SHEHAYEB, M.; HESSABI, R.; FUJISHIGE, N.; YERRAPRAGADA, S.; KANO, S.; SONG, N.; YANG, P.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; FARIA, S. M.; DAKORA, F. D.; WEINSTOCK, G.; HIRSH, A. M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant soil**, 2013.
- BERGENSEN, F. J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A. H.; SCHWINGHAMER, E. A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, Hangeue, v. 46, n. 1, p. 3-16, Dec. 1971.
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; DE FÁTIMA, M. L.; DEFARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 44-52, 2010.
- CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, Y. J.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N. SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461-7471, 2005.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 48, p. 1275-1284, 2013.

DAS, S. K.; MISHRA, A. K.; TINDALL, B. J.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: Analysis of phylogeny based on Chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. **Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 981-987, 1996.

FARIA S. M.; MELLO, R. B. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 3, dez. 1998, p. 1-4

FARIA, S. M. **Obtenção de Estirpes de Rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia. Recomendação Técnica, nº 1, dez/1999. p. 1-4.

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica nº 5, dez. 1999, p 1- 4.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v.6, p. 36-41, 2008.

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 Agrícola** (USP. Impresso), v. 66, p. 667-676, 2009.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, p. 215-226, 2009.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. **Oecologia Brasilienses**, v. 1, p. 459-467, 1995.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 516, p. 897-903, 1997.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw – Hill, 1928. 145 p.

GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ – MOLINA, E.; RIVAS, R. *Cohnella phaseoli* sp.nov., isolated from root nodules of *Phaseoli coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1855-1859, 2008.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology** (Print), v. 78, p. 6726-6733, 2012.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular, 347; Solução, 2).

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems. **Scientia Agrícola** (USP. Impresso), v. 70, p. 397-404, 2013.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

KAMPFER, P.; ROSSELLÓ-MORA, R.; FALSEN, E.; BUSSE, H. J.; TINDALL, B. J. *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of “*Paenibacillus hongkongensis*” as *Cohnella hongkongensis* sp.nov, v. 56, p. 781 – 786, 2006.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHENA, W. F.; CHENA, 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, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; 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 (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

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

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MOREIRA, F. M. S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. 152 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, 1991.

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, p. 135-146, 1993.

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

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**, Inglaterra, v. 7, p. 889-895, 1998.

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

MOREIRA, F. M. S. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio que Nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Ed. Lavras: UFLA, p. 621-666, 2008.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta sub class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 21, p. 948-950, 2001.

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 Microbiology**, v. 82, p. 477-484, 1997.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; SOARES, B. L.; BOMFETI, C. A.; SILVA, K.; FERREIRA, P. A. A.; MOREIRA, F. M. S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 1239-1250, 2014.

PARKER, M. A. Symbiotic relationships of legumes and nodule bacteria on Barro Colorado Island, Panama: A review. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 662-672, 2008.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, p. 905-911, 2010.

RASOLOMAMPIANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; BENA, G.; RAMARROSEN, L.; RAHERIMANDIMBY, M.; MOULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B.; AVARRE, J. C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α and β -Proteobacteria. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4135-4146, 2005.

SILVA, A. T. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro**. 2012 Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; 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** (Print), v. 35, p. 253-262, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A Caracterização cultural de 92 isolados obtidos de diferentes leguminosas no viveiro do Centro de Biodiversidade (Cebio) da Vale, localizado em Sabará, MG. Significado das letras e palavras no final da tabela: Tempo de aparecimento da colônia, Ph, Cor, CM – Consistência da massa da colônia, F- Forma, El. – Elevação, B – Borda, Sup. – Superfície, EPS – Produção de exopolissacarídeo, D.O – Detalhes ópticos, A.I – Absorção de indicador.

Isolado	Tempo	pH	Cor	CM	F	El.	B	Sup.	EPS	D.O	A.I
01-829	R	Ac	Am	G	C	C	O	L	P	O	S
01-827	R	Ac	Cr	G	C	C	I	L	A	O	S
01-830	R	Ac	Cr	G	C	D	I	L	M	T	S
01-831	R	Al	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-832	R	N	Cr	G	C	C	I	L	M	T	S
01-828	R	N	Cr	G	C	C	I	L	M	T	S
01-857	R	N	Cr	G	C	D	I	L	M	T	S
01-837	R	N	Cr	G	C	D	I	L	A	T	N
9J	R	Ac	Am	G	C	C	I	L	M	T	N
10J	R	N	Cr	S	P	L	I	L	E	O	N
01-856	R	Al	Cr	B	C	C	O	L	P	O	S
01-862	R	N	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-826	R	N	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-881	R	Al	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-812	R	Al	Cr	G	C	C	I	L	M	O	S
01-858	R	Ac	Am	V	C	D	I	L	M	T	S
01-867	R	N	Cr	G	C	C	I	L	P	O	S
01-855	R	Ac	Cr	G	C	C	I	L	A	T	S
01-836	R	Ac	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-823	R	Ac	Cr	G	C	C	I	L	A	T	N
01-851	R	Al	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-822	R	Ac	Cr	B	C	C	O	L	P	O	S
01-841	R	Al	Cr	B	C	L	I	L	E	O	S
24J	R	Al	Cr	B	C	L	I	L	P	O	S
01-869	R	N	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-875	R	N	Cr	B	C	C	I	L	P	O	S
01-853	I	N	Cr	B	C	C	O	L	P	O	S
01-868	I	Ac	Cr	G	C	C	I	L	M	O	S
01-885	L	Al	Cr	B	C	P	O	R	P	O	N
01-859	I	Ac	Cr	G	I	C	L	L	P	O	N
01-846	L	Al	Cr	A	I	C	I	L	P	T	N
01-819	L	Al	Cr	V	C	C	I	L	P	O	N
01-874	L	Al	Cr	V	C	C	I	L	P	T	N

“continua”

Tabela 1A “continuação”

Isolado	Tempo	pH	Cor	CM	F	El.	B	Sup.	EPS	D.O	A.I
01-806	I	N	Cr	B	C	C	O	L	P	O	S
01-843	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-810	L	Al	Cr	A	I	C	I	L	P	T	N
01-809	L	Al	Cr	G	I	C	I	L	P	T	N
38J	I	N	Br	S	P	L	I	L	E	O	S
01-816	L	Al	Cr	B	C	C	I	L	P	T	N
01-805	L	Al	Cr	B	C	C	I	L	P	O	N
01-871	L	Al	Cr	V	C	D	I	L	P	O	N
01-860	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-863	L	N	Br	S	P	L	F	R	E	O	S
01-883	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-804	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-814	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-842	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
48J	L	Ac	Am	S	I	L	O	R	E	O	N
01-870	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-813	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-872	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-876	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-820	L	Al	Cr	A	I	C	I	L	P	T	N
01-840	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-839	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	N
01-873	L	Al	Cr	A	I	C	I	L	P	T	N
01-865	R	Al	Cr	B	C	L	L	L	E	O	N
58J	R	Ac	Am	G	C	C	I	L	P	T	S
01-817	R	N	Cr	B	C	C	I	L	P	O	N
01-811	L	Al	Cr	A	C	C	I	L	P	T	N
01-864	I	Ac	Am	S	P	L	I	R	E	O	N
01-835	L	Al	In	A	C	C	I	L	P	T	N
01-808	I	Ac	Cr	G	C	C	I	L	P	T	S
01-833	L	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	O	S
01-825	I	Ac	Cr	B	C	P	F	L	P	O	N
01-818	I	Al	In	A	C	C	I	L	P	T	N
01-845	I	Al	Cr	G	I	C	I	L	P	O	N
68J	L	Al	Cr	V	C	C	I	L	P	O	N
01-882	I	N	Cr	S	P	L	F	L	E	O	S
01-821	R	Al	B	B	C	P	I	L	P	O	N
01-866	L	Al	Cr	A	C	C	I	L	P	O	N
01-847	I	Al	Cr	G	C	C	I	L	P	T	N
01-824	I	Al	Cr	A	C	C	I	L	P	O	N
01-854	I	Al	In	A	C	C	I	L	P	T	N
01-879	I	Al	In	A	C	C	I	L	P	T	N

“continua”

Tabela 1A “conclusão”

Isolado	Tempo	pH	Cor	CM	F	El.	B	Sup.	EPS	D.O	A.I
01-815	L	Al	Cr	A	C	C	I	L	M	O	N
01-849	L	Al	Br	V	C	C	I	L	P	O	S
01-838	I	N	Cr	B	C	C	O	L	P	O	S
01-807	L	Al	In	A	C	C	I	L	P	T	N
01-852	R	Ac	Cr	B	I	C	F	L	P	O	N
01-861	R	Ac	Am	S	C	L	I	L	E	O	N
01-877	R	Ac	Am	S	C	C	I	L	P	O	S
01-844	R	Al	Cr	V	C	C	I	L	P	T	N
84J	R	Ac	Am	S	P	L	I	L	E	O	S
01-848	L	Al	Am	A	C	C	I	L	M	O	N
01-850	R	N	Br	B	C	C	L	L	P	O	N
87J	R	Ac	Cr	B	I	P	F	L	P	O	S
88J	R	Ac	Am	S	C	L	I	L	P	O	S
01-878	I	Ac	Am	B	C	L	I	L	P	O	N
01-884	R	Ac	Am	S	P	P	I	L	P	O	N
01-834	L	Al	Cr	A	C	C	I	L	P	O	N
01-880	I	Al	Cr	A	C	C	I	L	P	O	N

Significado das letras utilizadas na identificação dos isolados: Tempo: dias para o aparecimento de colônias isoladas R: rápido (1 a 3), I: intermediário (4 a 5), L: lento (6 a 10), pH: modificação do pH meio de cultivo: Ac: acidificação, N: neutralização, Al: alcalinização, Cor: Cr: creme, B: branca, Am: amarela, CM: Consistência de massa da colônia: A: aquosa, B: butírica, G: gomosa, S: seca, V: viscosa, Forma: C: circular, I: irregular, P: puntiforme, elevação (plana, lente, convexa, drop-like, umbilicada ou umbanada), Elevação das colônias: P: plana, L: lente, C: convexa, D: drop-like, Borda: I: inteira, O: ondulada, F: filamentosa, L: lobada, Superfície: L: lisa, R: rugosa, EPS: produção de exopolissacarídeos: E: escassa, P: pouca, M: moderada, A: abundante, D.O: detalhes ópticos: T: transparente, O: opaca, A.I: absorção de indicador: S: sim, N: não.