



**ANALUIZA TORRES DA SILVA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS  
E NÃO SIMBIÓTICAS ISOLADAS DE  
NÓDULOS DE SIRATRO**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**ANALUIZA TORRES DA SILVA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS E NÃO SIMBIÓTICAS  
ISOLADAS DE NÓDULOS DE SIRATRO**

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

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

Dra. Ligiane Aparecida Florentino

**LAVRAS -MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Silva, Analuiza Torres da.

Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de  
nódulos de siratro / Analuiza Torres da Silva. – Lavras : UFLA,  
2012.

93 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Bactérias endofíticas. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3.  
Ácido 3-indol acético. 4. Solubilização de fostato. 5. Antibiótico. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**ANALUIZA TORRES DA SILVA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS E NÃO SIMBIÓTICAS  
ISOLADAS DE NÓDULOS DE SIRATRO**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2012.

Dra. Ligiane Aparecida Florentino	UFLA
Dr. Fábio Lopes Olivares	UENF
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA

Dra. Fatima M. S. Moreira

Orientadora

**LAVRAS -MG**

**2012**

*A Deus.*

*A minha família e companheiros de trabalho.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos;

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade para realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto internacional “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*” GF2715-02 (CSM-BGBD), coordenado pelo *Tropical Soil Biology and Fertility Institute* (TSBF) do CIAT, financiado do *Global Environmental Facility* (GEF), implementado pelo *United Nations Environment Program* (UNEP) e executado em sete países - Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda.

À professora Dr<sup>a</sup>. Fatima Maria de Souza Moreira, pela orientação, conhecimentos, confiança, tolerância, cobranças e conselhos.

À Dra. Ligiane A. Florentino, pela coorientação, incentivo, paciência e ensinamentos.

Ao prof. Dr. Fábio Lopes Olivares e prof. Dr. Disney Ribeiro Dias, pelas colaborações neste trabalho como membros da banca de defesa.

A todos os professores, pelo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pelo auxílio sempre prestado.

À Natana, pela grande disposição e ajuda na realização deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório e da universidade pela convivência, amizade, auxílio nos estudos e pesquisa.

A todos os amigos.

Aos meus pais: Cleide Teresa Torres e Silva e José Tadeu da Silva; ao meu marido: Brijesh Vikramlal Shah; aos meus irmãos: Ariane, Tanecy e Tiago;

aos meus cunhados: Benjamim, Danilo e Cristiane, pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente, e que sempre me apoiaram e incentivaram com todo carinho, mesmo a distância.

**A todos muito obrigada!**

## RESUMO

Além das bactérias nodulíferas de leguminosas, que disponibilizam o nitrogênio atmosférico para o desenvolvimento vegetal, existem dentro dos nódulos outras bactérias que não estabelecem simbiose com a planta, mas que podem apresentar funções distintas. Visando estudar a diversidade e função dessas bactérias, simbióticas e não simbióticas, de nódulos, utilizamos uma leguminosa considerada promíscua, *Macroptilium atropurpureum* (siratro), como planta isca para capturar estirpes bacterianas de solos da Amazônia. Em 53% dos nódulos foram encontrados mais de um morfotipo bacteriano, obtendo-se um total de 203 estirpes, de grande diversidade morfológica. Noventa e seis dessas estirpes foram reinoculadas no hospedeiro de origem e somente 16 estirpes foram autenticadas como nodulíferas, sugerindo que as outras estirpes constituem bactérias endofíticas não simbióticas, ou bactérias simbióticas que perderam o gene de nodulação ou ainda que não expressaram o gene responsável pela nodulação. Essas 16 estirpes nodulíferas foram selecionadas, juntamente com as estirpes isoladas do mesmo nódulo, as “estirpes companheiras”, para testes de identificação genética, testes de produção do hormônio ácido 3-indol acético (AIA), solubilização de fosfato de cálcio e alumínio, resistência a diferentes antibióticos e o efeito da coinoculação dessas estirpes em siratro. O sequenciamento do gene 16S DNA, identificou as estirpes nodulíferas como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas* e *Leifsonia* e as que não nodularam como pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Naxibacter* e *Massilia*. Os valores de produção de AIA pelas estirpes variaram de 0 a 218,77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na presença do triptofano, e de 0 a 54,68  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na ausência do aminoácido. Das estirpes estudadas, nenhuma foi capaz de solubilizar fosfato de Al, enquanto que para a solubilização de fosfato de Ca dez apresentaram Índice de Solubilização (IS) baixo ( $\text{IS} < 2 \text{ mm}$ ), e apenas uma apresentou IS intermediário ( $2 \leq \text{IS} < 4,0 \text{ mm}$ ). Foi observada alta diversidade em relação à resistência aos diferentes antibióticos. Em teste de coinoculação das estirpes bacterianas provenientes do mesmo nódulo, foi observado em alguns casos, aumento na matéria seca da parte aérea do siratro, indicando interação sinérgica entre as estirpes. Essas estirpes talvez possam também contribuir para o crescimento de outras espécies vegetais por mecanismos diferenciados, sendo, portanto, necessários mais testes envolvendo a inoculação em outras espécies de leguminosas, em ambientes controlados e em última análise, em campo.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Ácido 3-indol acético. Solubilização de fosfato. Antibiótico. Bactéria endofítica.



## ABSTRACT

Besides bacteria nodulating legumes, which provides the atmospheric nitrogen for plant growth, there are other bacteria within nodules which do not establish symbiosis with the plant, but may have distinct functions. In order to study the diversity and function of these symbiotic and non symbiotic bacteria of nodules, it was used a legume considered promiscuous, *Macroptilium atropurpureum* (siratro), as trap plant to capture bacterial strains of Amazonia soil. In 53% of the nodules were found more than one bacterial morphotype, yielding a total of 203 strains, in large morphological diversity. Ninety-six of these strains were re-inoculated into the host of origin and only 16 strains have been authenticated as nodulating, suggesting that other strains constitute endophytic bacteria non-symbiotic, or symbiotic bacteria which have lost the nodulation gene, or even that has not expressed the gene responsible for nodulation. These 16 nodulating strains were selected, together with the isolated strains of the same nodule, the "strains partners", for genetic identification test, production testing of the hormone indole-3-acetic acid (IAA), solubilization of calcium phosphate and aluminum, resistance to different antibiotics and the co-inoculation effect of these strains in siratro. By the sequencing of the gene 16S DNA, it was identified the nodulating strains as belonging to the genera *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas* and *Leifsonia*, and those who did not nodulate as belonging to the genera *Rhizobium*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Naxibacter* and *Massilia*. The values of IAA production by strains varied from 0 to 218.77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  in the tryptophan presence, and from 0 to 54.68  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  in the aminoacid absence. Between the strains studied, none was able to solubilize Al phosphate, while for the solubilization of Ca phosphate ten strains showed low Solubilisation Index (SI) ( $\text{SI} < 2$  mm), and only one showed intermediate SI ( $2 \leq \text{SI} < 4.0$  mm). High diversity between the strains was observed in relation to resistance to the different antibiotics. In some cases, experimental co-inoculation of bacterial strains from the same nodule showed increase in shoot dry matter of siratro, indicating synergistic interaction between the strains. These strains may perhaps also contribute to the growth of other plant species by different mechanisms, therefore, needed further tests involving inoculation in other legume species in controlled environments and ultimately, in the field.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Indole-3-acetic acid. Phosphate solubilization. Antibiotic. Endophytic bacteria.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 Floresta Amazônica e diversidade microbiana .....	17
2.2 Nodulação das leguminosas.....	18
2.3 Bactérias simbióticas fixadoras de Nitrogênio Atmosférico .....	20
2.4 Promiscuidade da leguminosa siratro .....	21
2.5 Bactérias endofíticas de nódulos.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1 Origem das amostras de solos.....	38
3.2 Captura, isolamento e caracterização das estirpes bacterianas .....	39
3.3 Experimentos para autenticação de bactérias nodulíferas .....	41
3.4 Sequenciamento do gene 16S DNA das estirpes bacterianas .....	42
3.5 Testes fenotípicos .....	43
3.5.1 Teste de produção de hormônio de crescimento vegetal -Auxina (ácido-3-indol acético ou AIA).....	43
3.5.2 Teste de solubilização de fosfato de Cálcio e Alumínio .....	44
3.5.3 Resistência a antibióticos.....	45
3.5.4 Teste de coinoculação .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
4.1 Captura, isolamento e caracterização fenotípica das estirpes bacterianas.....	48
4.2 Experimentos para autenticação de bactérias nodulíferas .....	49
4.3 Sequenciamento do 16S DNA das estirpes nodulíferas autenticadas e endofíticas .....	56
4.4 Produção de ácido-3-indol acético (AIA).....	60
4.5 Solubilização de fosfato Cálcio e Alumínio.....	65
4.6 Resistência a antibióticos.....	68
4.7 Teste de coinoculação .....	71
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	77
REFERÊNCIAS.....	78

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Imagem mostrando a existência de estirpe de *Agrobacterium* (fluorescência verde) dentro de nódulos de *Melilotus dentatus* inoculados com uma mistura de *Agrobacterium tumefaciens* CCBAU 81181 marcado com GFP e *Sinorhizobium meliloti* CCBAU 10062. Fonte: Wang et al. (2006) .....24
- FIGURA 2 Microscopia de Imunomarcção Fluorescente mediada com anticorpo a *Enterobacter* em cortes de nódulo de *Hedysarum spinosissimum* Fonte: Muresu et al. (2008) .....27
- FIGURA 3 Árvore filogenética baseada no sequenciamento do gene 16S rDNA de estirpes nodulíferas e endofíticas provenientes de nódulos de siratro e estirpes referências ..... 60
- FIGURA 4 Resultado de resistência e sensibilidade das estirpes a diferentes antibióticos .....70
- GRÁFICO 1 Número de nódulos com 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 estirpes. ....49

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) que nodulam *M. atropurpurem* .....22
- TABELA 2 Trabalhos que isolaram bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos de diversas leguminosas. ....30
- TABELA 3 Características químicas de dez amostras de solos coletadas sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia Ocidental.....39
- TABELA 4 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raíz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 01/09/10 a 10/10/10 (40 dias)..... 50
- TABELA 5 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raíz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 24/09/10 a 03/11/10 (40 dias)..... 52
- TABELA 6 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raíz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o

crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 05/11/10 a 15/12/10 .....	54
TABELA 7 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raíz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 31/03/11 a 10/05/11 (40 dias).....	55
TABELA 8 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de siratro, baseada nas sequências mais similares encontradas no GenBank (NCBI). .....	57
TABELA 9 Produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelas estirpes isoladas de <i>Macropitilium atropurpureum</i> cultivadas em meio 79 na ausência de triptofano .....	62
TABELA 10 Produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelas estirpes isoladas de <i>Macropitilium atropurpureum</i> cultivadas em meio 79 na presença de triptofano. ....	63
TABELA 11 Valores de IS e classificação das estirpes quanto à capacidade de solubilizar fosfato de Ca.....	66
TABELA 12 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raíz (MSR) das plantas de siratro coinoculadas com as estirpes bacterianas provenientes do mesmo nódulo (A, B, C, D, E, F e G) e	

das estirpes testadas isoladamente; Eficiência relativa (Efr) das estirpes em promover o crescimento vegetal e resultados dos testes fenotípicos realizados. Período do experimento: 31/08/11 a 10/10/11 (40 dias).....72

## **LISTA DE SIGLAS**

BNL	Bactérias nodulíferas de leguminosas
BFN	Bactérias fixadoras de nitrogênio
NN	Número de nódulos
MSN	Matéria seca do nódulo
MSPA	Matéria seca da parte aérea
MSR	Matéria seca da raiz

## 1 INTRODUÇÃO

Em geral, a biodiversidade é associada à fauna e flora, porém, a maior parte da biodiversidade provavelmente não é visível a olho nu e reside no solo. O interesse pelo estudo desses microrganismos presentes no solo é cada vez maior, uma vez que esses exercem importante função na regulação e funcionamento dos ecossistemas. A presença destes no solo pode ser considerada como indicador de sua qualidade (KENNEDY; PAPENDICK, 1995) e também do tipo de cobertura vegetal (JESUS et al., 2005; LIMA et al., 2009; NAVARRETE et al., 2011). Além disso, eles podem apresentar valor biotecnológico e econômico, representando uma grande fonte de produtos farmacêuticos, enzimas, corantes, ácidos orgânicos e muitos outros recursos ainda pouco explorados.

Dentre os microrganismos do solo, as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que estabelecem simbiose com leguminosas, também conhecidas por bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL), têm sido bastante estudadas. Essa simbiose resulta na formação de nódulos nas raízes e/ou caules dessas plantas e, como em todo processo simbiótico, os dois organismos são beneficiados. Nesse caso, a leguminosa fornece fonte de carbono para as bactérias, as quais fornecem o N total ou parcial ao desenvolvimento da planta. Dessa forma, os estudos com BNL são de grande importância devido à contribuição dessas para o fornecimento de nitrogênio, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), em diversos ecossistemas.

No entanto, alguns estudos têm mostrado que nos nódulos das leguminosas, além das BNL, são encontradas também outras bactérias, que são denominadas bactérias endofíticas dos nódulos (BENHIZIA et al., 2004; IBÁÑEZ et al., 2009; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; MHAMDI et al., 2005; MRABET et al., 2006; MURESU et al., 2008;



STAJKOVIC' et al., 2009; STURTZ et al., 1997; WANG et al., 2006). Essas bactérias podem promover o crescimento da planta (STURZ et al., 1997), contribuindo com a produção de hormônios de crescimento vegetal (SRIDEVI; MALLAIAH, 2007), absorção de nutrientes (RAJENDRAN et al., 2008; SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006) e aumento no número de nódulos (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; IBÁÑEZ et al., 2009; RAJENDRAN et al., 2008; STURTZ et al., 1997). No entanto, essas bactérias endofíticas de nódulos têm sido pouco estudadas em comparação aos endofíticos que habitam outros tecidos das plantas.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade fenotípica, genotípica e funcional de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos da planta-isca *Macropodium atropurpureum* (siratro), inoculada com suspensões de amostras de solos coletadas sob diferentes sistemas de uso da terra, na Amazônia Ocidental. Objetivou-se ainda averiguar a contribuição das bactérias não simbióticas em promover o crescimento vegetal do siratro quando coinoculadas com as bactérias simbióticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Floresta Amazônica e diversidade de bactérias nodulíferas de leguminosa (BNL)

A Floresta Amazônica representa 60% do território nacional, aproximadamente 5 milhões de Km<sup>2</sup> (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE 2004) com diferentes tipos de vegetação, e essa heterogeneidade também é constatada na geologia (RODRIGUES, 1996), no clima e nos solos (MOREIRA et al., 2006; RADAMBRASIL, 1977).

A Floresta Amazônica é um dos principais reservatórios de biodiversidade do planeta e ainda é pouco estudada, principalmente em relação à população microbiana do solo. Estudos mostram que estas assumem papel importante para a manutenção da sustentabilidade, visto que são responsáveis por atividades essenciais para o bom funcionamento dos ecossistemas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Um importante grupo de microrganismos do solo são as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que estabelecem simbiose com leguminosas, conhecidas vulgarmente por rizóbios, mas podendo também ser denominadas de bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL). Os estudos desenvolvidos em solos da região amazônica mostram a existência de uma elevada diversidade de BNL (JESUS et al., 2005; LIMA et al., 2009; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA; HAUKKA; YOUNG 1998; PEREIRA, 2000). Nesses estudos, as BNL são isoladas de nódulos coletados no campo ou por meio da utilização de leguminosas promíscuas, como o *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum*. Essas leguminosas estabelecem simbiose com várias espécies de diferentes gêneros de BNL, o que possibilita a avaliação da diversidade dessas bactérias no solo.

Estudos mostram que a densidade e diversidade de BNL nesses solos são influenciadas pelos diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) e que geralmente os solos sob pastagem e áreas de cultivo são os que apresentam maior densidade e diversidade, e que situação contrária é observada nos SUTs sob floresta (JESUS et al., 2005; PEREIRA, 2000).

Usando o siratro como hospedeira para estudar as comunidades de BNL ocorrendo em diferentes SUTs da região Amazônica, Lima et al. (2009) observaram que as amostras de solo sob agrofloresta e agricultura também induziram a formação de uma maior quantidade de nódulos no siratro, enquanto que a amostra de solo da floresta induziu a menor formação de número de nódulos. O fato de que foram observadas uma alta nodulação e diversidade, mesmo em sistemas manejados como agricultura e agrofloresta, sugere uma alta resiliência da comunidade de BNL às mudanças no uso da terra depois do desmatamento (LIMA et al., 2009).

Os estudos sobre diversidade de BNL têm isolado grande número de estirpes que estão sendo armazenadas em coleções de culturas para estudos genéticos, fenotípicos e classificação de novas espécies, que ampliará o nosso conhecimento sobre a diversidade, função e interação entre essas estirpes e as plantas hospedeiras.

## **2.2 Nodulação das leguminosas**

A família *Leguminosae* apresenta grande importância do ponto de vista econômico, podendo ser utilizada na exploração de madeira, celulose, energia, forragem, adubação verde, lenha, carvão e na recuperação de áreas degradadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa família é dividida em três subfamílias: *Papilionoideae*, *Mimosoideae* e *Caesalpinoideae*. Essas apresentam distribuição cosmopolita com espécies herbáceas, arbustivas, arbóreas e lianas. Uma parcela

representativa dessas plantas estabelece simbiose com as bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL), resultando na formação de estruturas especializadas denominadas nódulos, nas raízes e em alguns casos no caule.

Nos nódulos, as BNL reduzem o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ), a qual é disponibilizada para a planta. Esse processo é conhecido como fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) e é responsável por proporcionar parte ou todo o nitrogênio (N) necessário ao desenvolvimento da planta hospedeira. Esse elemento é constituinte de vários compostos em plantas, destacando-se os aminoácidos, ácidos nucleicos e clorofila. Assim, as principais reações bioquímicas em plantas envolvem a presença do N, o que o torna um dos elementos absorvidos em maior quantidade pelas plantas cultivadas. O N apresenta alta mobilidade no sistema solo-planta-atmosfera, perdendo-se facilmente por volatilização ou lixiviação e, além disso, os fertilizantes nitrogenados têm baixa eficiência de uso e alto custo de produção, o que permite considerar que sua utilização sem critério, além de elevar o custo do produto final, pode contaminar o meio ambiente.

Portanto, o processo de FBN é responsável por benefícios econômicos e ambientais e por isso tem recebido grande atenção da pesquisa no mundo todo. No Brasil, o melhor exemplo de utilização do processo de FBN é o da inoculação de BNL do gênero *Bradyrhizobium* sp. na cultura da soja (*Glycine max.* (L.) Merrill), onde a adubação nitrogenada é totalmente substituída (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

### **2.3 Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio atmosférico**

As bactérias que possuem o complexo enzimático denominado nitrogenase são capazes de realizar o processo de FBN, sendo também

conhecidas por bactérias diazotróficas. Essas estão distribuídas entre distintos grupos taxonômicos e apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), podendo ser encontradas em vida livre no solo, associados à planta contribuindo para o crescimento vegetativo sem a formação de estruturas diferenciadas, ou em simbiose com plantas da família *Leguminosae*, formando estruturas especializadas denominadas nódulos.

As bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL) possuem os genes da nodulação, genes *nod*. Esses genes são expressos em resposta a determinadas moléculas químicas (flavonoides) emitidas pela leguminosa hospedeira. Uma vez que os genes da nodulação são expressos, esses induzem a bactéria a sintetizar um sinal de reconhecimento pelo hospedeiro, os fatores Nod ou lipoquitooligossacarídeos (LCO). Após a liberação desses compostos, se houver um reconhecimento pela planta, inicia-se o encurvamento do pelo radicular e, posteriormente, a formação dos nódulos. Dessa forma, o processo de nodulação tende a ser específico.

As BNL são encontradas principalmente na subclasse  $\alpha$ -proteobactéria na ordem *Rhizobiales*, onde estão distribuídas nos gêneros *Rhizobium* (FRANK, 1889; JORDAN, 1984), *Sinorhizobium* sin.: *Ensifer*. (CHEN; YAN; LI, 1988; DE LAJUDIE et al., 1994; WILLEMS et al., 2003), *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998), *Bradyrhizobium* sin.: *Blastobacter* (JORDAN, 1982; VAN BERKUM; LEIBOLD; EARDLY, 2006; ZAVARZIN, 1961), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Devosia* (RIVAS et al., 2002, 2003), *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005), *Methylobacterium* (SY et al., 2001; JOURAND et al., 2004), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Agrobacterium* (CUMMINGS et al., 2009), *Shinella* (LIN et al., 2008). Entretanto, foi observado por Chen et al. (2001) e Moulin et al. (2001), que bactérias da

subclasse  $\beta$ -proteobactéria pertencentes à Ordem *Burkholderiales*, identificadas como *Burkholderia* sp. e *Cupriavidus* sp., também são capazes de se associar com leguminosas, mostrando que as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas não estão restritas à ordem *Rhizobiales* da subclasse  $\alpha$ -proteobactéria.

Essas descobertas indicam que a diversidade de procariotos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas pode ser mais ampla que a prevista e certamente conduzirão a avanços significativos no conhecimento da origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio, assim como sua manipulação pelo homem.

#### **2.4 Promiscuidade da leguminosa siratro**

A espécie *Macroptilium atropurpureum* (D.C.) Urb. (siratro), é uma leguminosa, trepadeira herbácea, perene com raízes profundas, originária do México e ocorre naturalmente em vários países da América Central e do Sul (PUPO, 1979). É considerada uma hospedeira promíscua por estabelecer simbiose com BNL de diferentes gêneros, como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (BROMFIELD; BARRAN, 1990; TRINICK; MILLER; HADOBAS, 1991), *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (FLORENTINO et al., 2009; GONÇALVES; MOREIRA, 2004; MOREIRA et al., 2006), além do gênero *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; SILVA, 2009) e *Cupriavidus* (FLORENTINO et al., 2009) da subclasse  $\beta$ -proteobactéria.

Podemos constatar na Tabela 1, os gêneros e espécies de BFN que nodulam *M. atropurpurem* com as respectivas estirpes tipos, mencionadas nas publicações originais de descrição das espécies.

Tabela 1 Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam *M. atropurpurem*

Gênero, espécie, referência	Estirpe tipo
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (FRANK, 1879, 1889) biovars <i>phaseoli</i> , <i>trifolii</i> , <i>viciae</i> (JORDAN, 1984)	ATCC10004 <sup>T</sup>
<i>Rhizobium giardinii</i> (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997) biovars <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i>	H152 <sup>T</sup>
<i>Rhizobium gallicum</i> (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997)	R602sp <sup>T</sup>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (JORDAN, 1984)	ATCC10324 <sup>T</sup>
<i>Bradyrhizobium canariense</i> (VINUESA et al., 2005)	BTA-1 <sup>T</sup>
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	
<i>Azorhizobium doebereinae</i> (syn. <i>A. johannae</i> ) (MOREIRA et al., 2006)	BR5401 <sup>T</sup>
<i>Mesorhizobium loti</i> (JARVIS; BPANKHURST; PATEL, 1982; JARVIS et al., 1997; JORDAN, 1984)	NZP2213 <sup>T</sup>
<i>Burkholderia</i> sp. (MOULIN et al., 2001)	
<i>Cupriavidus</i> (FLORENTINO et al., 2009)	

T: Estirpe tipo utilizada na descrição da espécie.  
 Fonte: Moreira e Siqueira (2006)

Portanto, o siratro tem sido muito utilizado em estudos de FBN e que objetivem a captura de BNL, por ser uma leguminosa promíscua e uma espécie de fácil manipulação devido ao seu pequeno porte.

## 2.5 Bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos

As bactérias endofíticas são as colonizadoras de tecidos internos da planta como flores, frutos, folhas, haste, raízes e sementes, protegidas pela planta de estresse ambiental e competição. Um dos conceitos do termo endofítico mais aceitos atualmente é de Hallmann et al. (1997), o qual sugere

que para ser considerada endofítica, a bactéria deve ser isolada de tecidos de plantas esterilizados superficialmente e também não causar danos aparentes à planta. Nesse conceito podem ser incluídos como microrganismos endofíticos tanto os de comportamento neutro, tendo como benefício apenas sua proteção, como os simbios, e ainda aqueles que transitam entre colonizando ora endofiticamente ora como epífitas.

Os próprios nódulos das leguminosas podem ser colonizados internamente por vários gêneros de bactérias não relacionadas às BNLs (BENHIZIA et al., 2004; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; MHAMDI et al., 2005; MRABET et al., 2006; MURESU et al., 2008; IBÁÑEZ et al., 2009; STAJKOVIĆ et al., 2009; STURTZ et al., 1997; WANG et al., 2006), que talvez entrem nos tecidos das plantas juntamente com os rizóbios (HUNG et al., 2007).

Os endofíticos não simbióticos de nódulo mais estudados são as estirpes de *Agrobacterium* (ANYANGO et al., 1995; CUMMINGS et al., 2009; DE LAJUDIE et al., 1999; GAO et al., 2001; GAO et al., 2004; HAN; WANG; CHEN, 2005; KHBAYA et al., 1998; LIU et al., 2005; MHAMDI et al., 2005; MRABET et al., 2006; ODEE et al., 2002; ; TAN et al., 1997; WANG et al., 2006), enquanto diversas bactérias, incluindo estirpes do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* e da família Entereobactereacea (BENHIZIA et al., 2004; IBÁÑEZ et al., 2009; JARAMILLO, 2010; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009; SILVA, 2010) também tem sido isoladas de nódulos.

Estirpes simbióticas do gênero *Agrobacterium* foram reclassificadas para o gênero *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001). Outras estirpes de *Agrobacterium* foram isoladas de nódulos de várias leguminosas e verificadas como sendo estirpes endofíticas não simbióticas (DE LAJUDIE et al., 1999; LI et al., 2008; WANG et al., 2006). A estirpe endofítica não simbiótica de nódulo *Agrobacterium* pode especificamente reduzir a nodulação de *Rhizobium*



*gallicum* em feijão comum (MRABET et al., 2006), mas não afetou a nodulação de *Sinorhizobium meliloti* em alfafa (*Melilotus dentatus*) (WANG et al., 2006).

Evidências de que estirpe não simbiótica de *Agrobacterium tumefaciens* pode co-habitar com estirpe nodulífera de *S. meliloti* em nódulos de *Melilotus dentatus* foi comprovada usando marcador fluorescente (Figura 1), reisolamento de nódulos, eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), e amplificação por PCR de genes simbióticos por Wang et al. (2006).

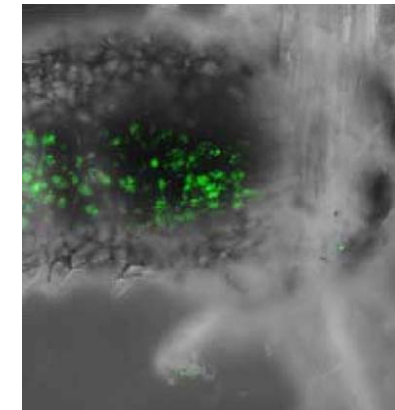


Figura 1 Imagem mostrando a existência de estirpe de *Agrobacterium* (fluorescência verde) dentro de nódulos de *Melilotus dentatus* inoculados com uma mistura de *Agrobacterium tumefaciens* CCBAU 81181 marcado com GFP e *Sinorhizobium meliloti* CCBAU 10062. Os nódulos foram observados com microscópio confocal de varredura a laser

Fonte: Wang et al. (2006)

Um grupo de pesquisadores isolou estirpes relacionadas à *Agrobacterium* de nódulos de *Vicia angustifolia*, *V. sativa*, *V. bungei*, *V. faba*, *Melilotus albus*, *M. dentatus* e *Onobrychis viciaefolia*, assim como estirpes relacionadas a *Enterobacteriaceae*, de nódulos de *Vicia angustifolia*, *V. faba*, *Oxytropis ochrocephala* e *Oxytropis glabra* e estirpes do gênero *Stenotrophomonas* de nódulos de *V. angustifolia* (KAN et al., 2007). Este último gênero possui estirpes fixadoras de N<sub>2</sub>, porém não simbióticas até então conhecidas (LIBA et al., 2006).

Outros pesquisadores também isolaram estirpes de *Stenotrophomonas* de nódulos de *M. atropurpureum* (LIMA et al., 2009) e de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (JARAMILLO, 2010), além de outras estirpes simbióticas e não simbióticas do gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flexibacter* e *Janthinobacterium*.

Estirpes de *Pseudomonas* são endofíticas comuns em nódulos radiculares (BENHIZIA et al., 2004; IBÁÑEZ et al., 2009; JARAMILLO, 2010; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; LIMA et al., 2009). Estirpes de *Burkholderia cepacia* também foram relatadas como habitantes de nódulos de leguminosas tropicais (VANDAMME et al., 2002) e de soja (LI et al., 2008).

As espécies de *Bacillus pumilus*, *Serratia plymuthica* e *Acinetobacter calcoaceticus* foram primeiramente relatadas como bactérias endofíticas de nódulo de soja por Li et al. (2008). Algumas outras espécies do gênero *Bacillus* foram encontradas em nódulos de diversas leguminosas por outros autores (JARAMILLO, 2010; LIMA et al., 2009; MURESU et al., 2008; SILVA, 2010).

O primeiro relato de que estirpes pertencentes à classe  $\gamma$ -Proteobactéria ocupam nódulos foi relatado por Benhizia et al. (2004), que identificaram estirpes dos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Escherichia* e *Pseudomonas* isoladas de nódulos de espécies selvagens do gênero *Hedysarum*. Neste estudo, o método de desinfestação dos nódulos foi realizado pela imersão em etanol 95% por 20 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio 5% por 3 minutos e por último, sete lavagens em água destilada.

Posteriormente, Muresu et al. (2008) avaliaram 100 nódulos de espécies selvagens coletados em Sardenha e Argélia, e dificilmente obtiveram-se estirpes de BNL cultiváveis, enquanto que mais de 10 gêneros diferentes de bactérias não simbióticas foram obtidas. Nenhuma dessas estirpes cultiváveis foi capaz de nodular a planta hospedeira de origem quando reinoculadas em condições

estéreis. Apesar da incapacidade de cultivar os endossimbiontes de rizóbios usando meios de cultura padrões (YMA e PCA - Agar Padrão para Contagem), uma análise do gene 16S rRNA por PCR diretamente dos nódulos, revelou que a maioria desses continham BNL como população predominante, mas havia também a presença de outras estirpes não nodulíferas dos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Ralstonia* e *Thiobacillus*.

A presença de endofíticos de nódulos, juntamente com os rizóbios, foi verificada então neste trabalho de Muresu et al. (2008), por microscopia de imunofluorescência de cortes de nódulos usando anticorpos, primário e secundário, específicos, como se observa na Figura 1 (MURESU et al., 2008).

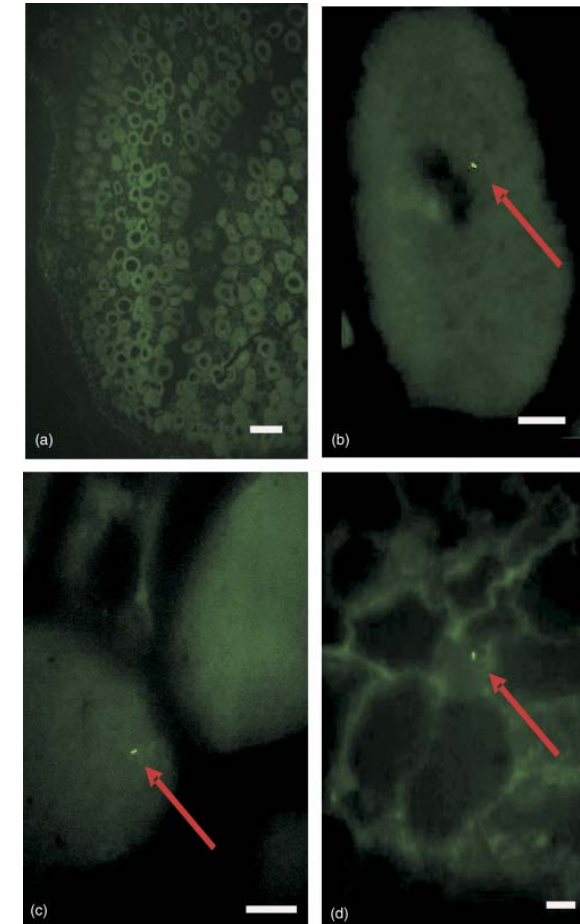


Figura 2 Microscopia de Imunomarcaco Fluorescente mediada com anticorpo a *Enterobacter* em cortes de nódulo de *Hedysarum spinosissimum*. (a) Imagem  baixa magnificao do nódulo mostrando nível de fluorescência. (b-d) Exemplos de alta magnificao de estirpe de bastonete fluorescente (indicado com as setas) entre a massa escura de bacteroides não fluorescente. Escalas: (a) 0,1 mm; (b-d) 10 mm  
 Fonte: Muresu et al. (2008)

O fato de não conseguir cultivar as BNLs dos nódulos por Muresu et al. (2008), foi comum, pois foram testadas 11 espécies de leguminosas, incluindo anuais e perenes, pertencentes a seis gêneros distribuídos em três tribos.

A possibilidade de um procedimento ineficiente de esterilização como causa para o isolamento de estirpes não esperadas provenientes de nódulos pode ser descartada, pois foram testadas variações no procedimento de isolamento (MURESU et al., 2008). Foram testados diferentes métodos padrões utilizados para desinfestação superficial dos nódulos, com hipoclorito e cloreto de mercúrio (JORDAN, 1984; SOMASEGARDEN; HOLBEN, 1985; VINCENT, 1970). Para checar a possibilidade de um dano osmótico ou impacto salínico nas estirpes de BNL foram testadas, tanto a solução salina quanto a água destilada para ressuspender as bactérias dos nódulos macerados antes do plaqueamento. Além disso, considerando uma possível sensibilidade a acidez pelas BNLs, como mencionadas para certas estirpes de *Sinorhizobium meliloti* (HOWIESON; ROBSON; ABBOTT, 1992) e *Bradyrhizobium* (MACCIÒ; FABRA; CASTRO, 2002), utilizou-se meio YMA contendo carbonato de cálcio (JORDAN, 1984) e meio com tampão fosfato (HOWIESON; EWING; D'ANTUONO, 1988; NANDASENA et al., 2001). Explorando a possibilidade de uma dependência sazonal na viabilidade das estirpes de BNL, nódulos foram coletados durante o inverno e a primavera. Em todos esses testes foi considerado como controle positivo, nódulos de *H. coronarium*, e sempre foram obtidas estirpes de *Rhizobium sllae* desses nódulos. Mesmo com essas variações nos procedimentos de isolamento não foi possível cultivar BNL ou evitar que estirpes imprevisíveis fossem isoladas (MURESU et al., 2008).

Deve-se levar em consideração que muitas bactérias, incluindo as *gram*-negativas, entram num estado conhecido como “Viável, mas não cultivável” (*Viable but nonculturable* – *VBNC*), no qual a habilidade de formar colônias é reduzida quando plaqueadas em meio de crescimento sólido, apesar de estarem viáveis e capazes de retomarem a atividade metabólica. Normalmente, esse estágio de *VBNC* é estabelecido em resposta a condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento (ALEXANDER; PHAM; STECK, 1999;

MANAHAN; STECK, 1997; MCDUGALD et al., 1998; OLIVER et al., 1995; TOFFANIN et al., 2000; XU et al., 1982).

Em 2009, outro grupo de pesquisadores também isolou estirpes pertencentes à classe  $\gamma$ -Proteobactéria, dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, de dentro de nódulos de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (IBÁÑEZ et al., 2009). Tais estirpes, quando reinoculadas na planta hospedeira não foram capazes de formar nódulos, e quando coinoculadas com uma estirpe eficiente de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 foram detectadas por ERIC-PCR colonizando internamente os nódulos, sendo consideradas, portanto, bactérias oportunistas. Esse foi o primeiro relato da presença de estirpe do gênero *Klebsiella* sp. em nódulos.

Neste estudo, foi observado ainda, um aumento de 83% no número de nódulos quando as plantas foram coinoculadas com estirpe de *Enterobacter* e *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, em comparação às plantas apenas inoculadas com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. Considerando que a estirpe de *Enterobacter* deste trabalho produz ácido indol-acético, e que esse hormônio promove a formação de raízes laterais, especula-se que essas plantas inoculadas com tal estirpe apresentavam mais áreas para a infecção por *Bradyrhizobium* sp. (IBÁÑEZ et al., 2009).

Informações relacionadas a alguns trabalhos citados acima, que isolaram bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos, estão elucidadas na Tabela 2.

TABELA 2. Trabalhos que isolaram bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos de diversas leguminosas.

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Li et al., 2008	Soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	-	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter ludwigii</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ,	Produção de ácido-3-indol acético; Solubilização de fosfato de Ca; Fixação de nitrogênio em vida livre.	Vincent, 1970
Benhizia et al., 2004	<i>Hedysarum spinosissimum</i> subsp. <i>capitatum</i> , <i>Hedysarum pallidum</i> , <i>Hedysarum carnosum</i>	-	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacter kobei</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Leclercia adecarboxylata</i> , <i>Escherichia vulneris</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	-	Imersão em etanol 95 % por 20 segundos, em seguida em hipoclorito de sódio 5% por 3 minutos e por último sete lavagens em água destilada estéril.
Jaramillo, 2010	Feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )	<i>Rhizobium</i> sp., <i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Bosea</i> sp.	-	-

Tabela 2, continua...

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Kan et al., 2007	<i>Vicia angustifolia</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Vicia bungei</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vicia villosa</i> , <i>Vicia amoena</i> , <i>Vicia cracca</i> , <i>Vicia sepium</i> , <i>Oxytropis glabra</i> , <i>Oxytropis psammocharis</i> , <i>Oxytropis kansuenses</i> , <i>Oxytropis ochrocephala</i> , <i>Oxytropis myrophylla</i> , <i>Oxytropis bicolor</i> , <i>Oxytropis</i> sp., <i>Medicago archiducis-nicolai</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Medicago lupulina</i> , <i>Melilotus albus</i> , <i>Melilotus dentatus</i> , <i>Melilotus officinalis</i> , <i>Onobrychis viciaefolia</i> .	<i>Rhizobium leguminosarum Agrobacterium</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Sinorhizobium fredii</i> , <i>Mesorhizobium</i> sp.	132 características fenotípicas testadas: Utilização de açúcares, alcoóis e ácidos orgânicos como fonte de carbono. Utilização de aminoácidos como fonte de nitrogênio. Resistência a antibióticos, a reagentes químicos e a várias concentrações de NaCl; Crescimento bacteriano em diferentes valores de pH; Algumas características bioquímicas (Gao et al., 1994)	Vincent, 1970
Ibáñez et al., 2009	Amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	-	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Produção de ácido-3-indol-acético por estirpes de <i>Enterobacter</i> .	Taurian et al., 2002 e 2006



Tabela 2, continua...

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Muresu et al., 2008	<i>Hedysarum spinosissimum</i> , <i>Hedysarum glomeratum</i> , <i>Hippocrepis unisiliquosa</i> , <i>Scorpiurus muricatus</i> , <i>Tetragonolobus purpureus</i> , <i>Ornithopus compressus</i> , <i>Ornithopus pinnatus</i> , <i>Psoralea bituminosa</i> , <i>Hedysarum spinosissimum</i> ssp. <i>capitatum</i> , <i>Hedysarum pallidum</i> , <i>Hedysarum carnosum</i> , <i>Hedysarum naudinianum</i> .	<i>Rhizolium</i> sp., <i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Bacillus simplex</i> , <i>Bacillus magaterium</i> , <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Pantoea ananatis</i> , <i>Erwinia persicina</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas lini</i> , <i>Pseudomonas viridiflava</i> , <i>Curtobacterium flaccunifaciens</i> , <i>Curtobacterium herbarum</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus pasteurii</i> , <i>Xanthomonas translucens</i> , <i>Microbacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Thiobacillus</i> sp.	Redução de acetileno (ARA); Atividade da nitrogenase; Microscopia de luz e eletrônica. Microscopia de imunofluorescência para detectar <i>Enterobacter agglomerans</i> em nódulos; Sensibilidade osmótica das BNL quando a solução salina e água destilada para resuspendar as bactérias dos nódulos macerados antes do plaqueamento; Sensibilidade a acidez; Viabilidade sazonal das estirpes de BNL, sendo nódulos foram coletados durante o inverno e a primavera.	Dois métodos: -Imersão em etanol 95% por 20 segundos, seguido de NaClO 5% por 3 minutos e por último sete lavagens em água destilada estéril; - Idem anterior, com HgCl <sub>2</sub> 0.1% ao invés de NaClO, por 2 minutos, e lavagem em água destilada estéril por 10 vezes

Tabela 2, continua...

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Wang et al., 2006	<i>Crotalaria pudica</i> , <i>Crotalaria pollida</i> , <i>Mimosa invisa</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Trifolium fragiferum</i> , <i>Astragalus adsurgens</i> , <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> , <i>Caragada micropylla</i> , <i>Caragada pruinosa</i> , <i>Sophora viciifolia</i> , <i>Vicia bungei</i> , <i>Vicia angustifolia</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Melilotus dentatus</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Onobrychis viciaefolia</i>	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	Imersão em etanol 95% por 30 segundos, em seguida em HgCl <sub>2</sub> 0,1% por 3 minutos e por último seis lavagens em água destilada estéril. (Vincent 1970).
Hung et al., 2007	Soja ( <i>Glycine max</i> e <i>Glycine soja</i> )	-	-	Produção de ácido-3-indol acético, de celulase, de pectinase, e HgCl <sub>2</sub> 0,1% por 3 minutos, e lavados 10 vezes em água estéril. Motilidade; Resistência a antibiótico (Estreptomicina); Coloração de gram	Etanol 70% por 30 segundos, seguido de HgCl <sub>2</sub> 0,1% por 3 minutos, e lavados 10 vezes em água estéril.
Gao et al.,	<i>Astragalus adsurgens</i>	<i>Rhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Sinorhizobium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	Vincent, 1970

Tabela 2, continua...

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Lima et al., 2009	Siratro ( <i>Macroptilium atropurpureum</i> )	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Rhizobium etli</i> , <i>Rhizobium galegae</i> , <i>Azorhizobium</i> sp., <i>Sinorhizobium mediacae</i> , <i>Mesorhizobium</i> sp., <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Azorhizobium</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Flexibacter</i> sp., <i>Janthinobacterium</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-
Stajković et al., 2009	Alfafa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp., <i>Brevibacillus</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	Solubilização de fosfato usando meio Plovsckaya (PVK) e NBRIP; Produção de ácido orgânico; Produção de amônia; Resistência a antibióticos (Neomicina, Novobiocina, Trimetoprima, Bacitracina, Cefalexina, Clindamicina)	Vincent, 1970

Tabela 2, continua...

Referência	Leguminosa hospedeira	Bactérias simbióticas isoladas de nódulos	Bactérias não simbióticas isoladas de nódulos	Testes fenotípicos e microscopia	Método de desinfestação do nódulo
Silva, 2010	<i>Acacia multipinnata</i> , <i>Calopogonium mucunoides</i> , <i>Desmodium adscendens</i> , <i>Dalbergia inundata</i> , <i>Entada</i> sp., <i>Inga caymannensis</i> , <i>Inga edulis</i> , <i>Inga heterophylla</i> , <i>Inga umbellifera</i> , <i>Inga venusta</i> , <i>Machaerium floribundum</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Mimosa quadrivalvis</i> , <i>Pueraria phaseoloides</i> , <i>Piptadenia suaveolens</i> , <i>Pitryocarpa pteroclada</i> .	<i>Rhizobium</i> sp	<i>Brevibacillus</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pantoea</i> sp. <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas Klebsiella</i> <i>Chryseobacterium</i> <i>Bacterium</i> <i>Burkholderia</i> Bactéria Gram negativa	Produção de ácido-3-indol acético	Imersão em álcool etílico 95% em seguida em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 1 minutos e depois lavados seis vezes em água destilada estéril
Sturtz et al., 1997	Trevo vermelho ( <i>Trifolium pratense</i> L.)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ; <i>Rhizobium loti</i> .	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus insolitus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bortedella avium</i> , <i>Curtobacterium citreum</i> , <i>Curtobacterium flaccunifaciens</i> , <i>Curtobacterium luteum</i> , <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fragi</i>		Lavagem em água corrente e detergente comercial, agitados em "wrist-action shaker" por 1 minuto em soluções sucessivas de NaClO (2.0% CT disponível) e peróxido de hidrogênio 15%, lavados 3 vezes em água destilada estéril.

Outros trabalhos também evidenciam a promoção no desenvolvimento vegetal devido à coinoculação de estirpes simbióticas e estirpes endofíticas não simbióticas (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; RAJENDRAN et al., 2008; SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006), como o aumento da nodulação (RAJENDRAN et al., 2008; STURTZ et al., 1997; TILAK et al., 2006; TURNER; BACKMAN, 1991) e redução de doenças nas raízes (TURNER; BACKMAN, 1991).

A coinoculação com estirpes não simbióticas de *Paenibacillus polymyxa* e de simbiótica de *Bradyrhizobium* sp., proporcionou um aumento nas concentrações de cálcio, ferro e fósforo na matéria seca da parte aérea de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006). Foi relatado também um aumento no conteúdo de clorofila, crescimento e nodulação de ervilha d'Angola (*Cajanus cajan*), pela coinoculação de estirpes de *Bacillus* com *Rhizobium* spp. (RAJENDRAN et al., 2008).

A inoculação de bactérias como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus cereus*, em conjunto com estirpes eficientes de *Rhizobium*, resultaram num aumento significativo no crescimento da planta e nodulação de ervilha d'Angola (*Cajanus cajan* (L) Milsp.) em relação aos tratamentos apenas inoculados com estirpe de *Rhizobium* ou sem inoculação. Além disso, afetaram o crescimento e a fixação de nitrogênio em ervilha d'Angola, por promover um aumento na ocupação dos nódulos dessa leguminosa, pela estirpe de *Rhizobium* sp. (AR- 2-2 k), com um aumento de 50% (com *Rhizobium* sozinho) a 85% na presença de *Pseudomonas putida* (TILAK et al., 2006).

A coinoculação de duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 e SEMIA 5080) com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 e PRBS-1) também apresentou ganhos consideráveis no rendimento de grãos de soja e foi o tratamento com maior teor de N nos grãos, acumulando 29 kg ha<sup>-1</sup> de N a mais

do que as plantas infectadas com a população nativa do local do experimento em campo, e até 10 kg ha<sup>-1</sup> de N a mais do que as plantas inoculadas com apenas as estirpes de *Bradyrhizobium* (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999).

Os efeitos benéficos da coinoculação de rizóbio com bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos podem resultar, como citado anteriormente, da síntese de hormônios de crescimento vegetal, como ácido indolacético e ácido abscísico, que estimulariam o crescimento radicular, aumentando os sítios para a nodulação (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; IBÁÑEZ et al., 2009; SRIDEVI; MALLAIAH, 2007; VERMA; YADAV; TIWARI, 2010). Além disso, a produção de hormônios de crescimento vegetal por bactérias endofíticas, por estimular o crescimento das raízes e aumentar a capacidade de captação de água e nutrientes pela planta, pode favorecer a nodulação sob condições de estresse, conforme sugerido por Turner e Backman (1991).

As bactérias endofíticas não simbióticas de nódulos, e até mesmo as bactérias nodulíferas, podem ainda promover o crescimento da planta por outros mecanismos como a solubilização de fosfatos (ALIKHANI; SALEN-RASTIN; ANTOUN, 2006; ANTOUN et al., 1998; DAIMON et al., 2006; HARA; OLIVEIRA, 2005; LINU; STEPHEN; JISHA, 2009; MARRA et al., 2011; PEIX et al., 2001; SRIDEVI; MALLAIAH; YADAV, 2007; VERMA; YADAV; TIWARI, 2010; YADEGARI; RAHMANI, 2010), produção de sideróforos e controle de microrganismos fitopatogênicos (ANTOUN et al., 1998; VERMA; YADAV; TIWARI, 2010; YADEGARI; RAHMANI, 2010).

É importante que as estirpes eficientes nos processos de FBN, como as estirpes endofíticas a serem utilizadas como inoculantes, apresentem boa competitividade com a população nativa do solo, por isso, teste de resistência a diferentes antibióticos produzidos por outros microrganismos do solo é um fator importante a ser considerado na seleção das estirpes.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Origem das amostras de solos

Neste estudo, as amostras de solos utilizadas foram coletadas sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) no sudoeste do Estado do Amazonas, cuja região é denominada de Alto Solimões, na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru, entre as coordenadas geográficas 4°20' e 4°26' sul e 69°36' e 70°2' oeste. Os SUTs estudados foram caracterizados, por Fidalgo et al. (2005), quanto à cobertura vegetal e ao uso atual. As comunidades da região estão organizadas em associações que praticam agricultura de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal e representam um dos mais importantes *hotspots* em termos de agrobiodiversidade (FIDALGO et al., 2005; MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2005).

Foram utilizadas 10 amostras de solos, sendo duas sob pastagem (ponto 82 e ponto 94), duas sob floresta (ponto 7 e ponto 57), duas sob agricultura (ponto 49 e ponto 82A), duas sob agrofloresta (ponto 72 e ponto 77), uma sob capoeira (ponto 70 A) e uma sob capoeira nova (ponto 19 A). A análise das características químicas do solo foi realizada conforme métodos compilados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (1997) e os resultados encontram-se na Tabela 3.

Antes de realizar a coleta das amostras, retirou-se a serrapilheira do local e todo material a ser utilizado foi flambado para evitar contaminação microbiológica entre os pontos. As amostras de solos foram coletadas em março de 2008 e armazenada a 4°C até a data de instalação do experimento, julho de 2008.

Tabela 3 Características químicas de dez amostras de solos coletadas sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia Ocidental

SUTs	pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	P	K	S	MO
		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			-----mg dm <sup>-3</sup> ----		dag kg <sup>-1</sup>	
Agricultura, ponto 49	5,1	5,6	2,3	2,2	7,1	136	6,6	2,1
Agricultura, ponto 82A	5,2	2,3	1,7	3,4	2,8	39	5,4	1,4
Pastagem, ponto 82	5,2	2,3	1,7	3,4	2,8	39	5,4	1,4
Pastagem, ponto 94	5,2	1,8	0,6	4,7	2,3	31	5,8	1,6
Floresta, ponto 57	4,5	5,1	2,9	4,2	4,0	86	8,4	2,2
Floresta, ponto 7	4,5	2,7	1,9	5,2	3,7	52	4,9	1,6
Capoeira, ponto 70 A	4,7	4,9	2,8	4,2	2,3	52	5,4	1,6
Capoeira nova, ponto19A	6,0	12,4	2,7	0,0	2,8	74	8,9	1,6
Agrofloresta, ponto 72	5,5	9,9	2,7	0,3	9,3	63	10,3	1,6
Agrofloresta, ponto77	5,8	12,7	4,3	0,2	2,5	58	6,2	2,1

### 3.2 Captura, isolamento e caracterização das estirpes bacterianas

Para a captura das BNL nativas presentes nas amostras de solo, em julho de 2008 foi instalado um experimento na casa de vegetação, em frascos de vidro escuro contendo 350 mL de solução nutritiva de *Hoagland* (HOAGLAND; ARNON, 1950) diluída quatro vezes.

Dois tratamentos controles sem inoculação foram adicionados: um com baixa concentração de nitrogênio mineral (N) e outro com maior concentração de N, para comprovar a ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação com baixa concentração de N, a solução continha 5,25 mg.L<sup>-1</sup> de N, a qual é considerada apenas uma dose de arranque para o processo de FBN, por isso considerada genericamente solução “Sem N mineral”. Para 4L dessa solução de Hoagland, foram adicionados em água destilada os seguintes volumes (mL) das soluções estoques: 0,1 de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (115,03 g.L<sup>-1</sup>); 0,6 de KNO<sub>3</sub> (101,11 g.L<sup>-1</sup>); 0,4 de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (236,16 g.L<sup>-1</sup>); 2,0 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (246,9 g.L<sup>-1</sup>);



3,0 de  $K_2SO_4$  ( $87,13 \text{ g.L}^{-1}$ ); 10 de  $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$  ( $12,6 \text{ g.L}^{-1}$ ); 200 de  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  ( $1,72 \text{ g.L}^{-1}$ ); 10 de  $FeCl_3$  (1%); 1 de micronutrientes [ $H_2BO_3$  2,86 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1,81 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $Na_2Mo_4 \cdot H_2O$  0,092 mg]. $L^{-1}$ ].

No controle sem inoculação e com nitrogênio mineral, utilizou-se a solução de Hoagland completa, com  $52,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio. Para o preparo de 4L dessa solução, foram adicionadas as seguintes quantidades (mL) das soluções estoques: 1,0 de  $NH_4H_2PO_4$  ( $115,03 \text{ g.L}^{-1}$ ); 6,0 de  $KNO_3$  ( $101,11 \text{ g.L}^{-1}$ ); 4,0 de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  ( $236,16 \text{ g.L}^{-1}$ ); 2,0 de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $246,9 \text{ g.L}^{-1}$ ); 10 de  $FeCl_3$  (1%); 1 de micronutrientes [ $H_2BO_3$  2,86 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1,81 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $Na_2Mo_4 \cdot H_2O$  0,092 mg]. $L^{-1}$ ].

Para preparo dos frascos, inoculação com as suspensões das amostras de solo e plantio foram adotadas as metodologias descritas por Florentino et al. (2009) e Florentino e Moreira (2009). Para a escarificação das sementes de siratro foi utilizado com ácido sulfúrico P.A. por dez minutos, lavadas sucessivamente em água destilada estéril, imersas em água estéril por 2 horas e colocadas em placas de Petri com algodão umedecido com água destilada, deixadas em câmara de crescimento a  $28^\circ C$  até a germinação e posterior semeadura.

O experimento foi instalado em delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento. Após 40 dias em casa de vegetação, todos os nódulos presentes nas raízes de siratro foram destacados e utilizados para o isolamento das BNL de seu interior. Para a desinfestação superficial dos nódulos antes do isolamento, os nódulos foram imersos em álcool etílico 95% por 30 segundos, em seguida, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) P.A. por 1 minuto e, depois, lavados seis vezes com água destilada estéril. A cada desinfestação dos nódulos de plantas diferentes foram trocados todos os reagentes (álcool,  $H_2O_2$  e água). Posteriormente, foram obtidas as

colônias isoladas e plaqueadas para purificação em placas contendo meio de cultura “79” (FRED; WAKSMAN, 1928), também conhecido como YMA (VINCENT, 1970). Após a purificação das estirpes foi realizada a caracterização morfológica das colônias bacterianas.

### **3.3 Experimentos para autenticação de bactérias nodulíferas**

Foram selecionadas, aleatoriamente, 96 estirpes dentre as 203 isoladas de nódulos de siratro com diferentes características morfológicas, com o objetivo de verificar sua capacidade nodulífera. Foram instalados quatro experimentos em casa de vegetação com duração de 40 dias cada, com início nas seguintes datas: 01/09/10, 24/09/10, 05/11/10 e 31/03/11, com 33, 30, 17 e 16 estirpes testadas em cada experimento, respectivamente. As plantas foram cultivadas em frascos de vidro escuro, como descrito anteriormente. Para a inoculação, as estirpes selecionadas foram crescidas em meio “79” líquido sob agitação, por cerca de três a seis dias de acordo com a taxa de crescimento das estirpes. No momento de plantar uma semente de siratro por frasco, foi inoculado um mL da suspensão bacteriana na fase log. Dois tratamentos controle sem inoculação também foram adicionados: um sem nitrogênio mineral (S/N) e o outro contendo nitrogênio mineral (C/N), além do controle positivo de nodulação com a estirpe nodulífera UFLA 04-212, da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, de comprovada eficiência em estabelecer simbiose com o siratro (Florentino et al., 2009). Os experimentos foram conduzidos por 40 dias em DIC, com três repetições. Após esse período, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), matéria seca do nódulo (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e eficiência relativa (Efr).

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.4 Sequenciamento do gene 16S DNA das estirpes bacterianas

Para o sequenciamento do gene 16S, foram selecionadas as estirpes autenticadas e além dessas, foram incluídas as outras estirpes bacterianas isoladas do mesmo nódulo, que neste trabalho, foram denominadas de “estirpes companheiras”.

Para extração do DNA, utilizou-se o *kit* de extração do DNA genômico bacteriano ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ da *Zymo Research* e para a amplificação parcial do gene 16S rDNA foi utilizado os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991) de culturas na fase logarítmica em meio “79”. Aliquotas de 5, 10 ou 15 µl do *template* dos DNA extraídos das estirpes, foram utilizados para 50 µl de reação de PCR. A concentração final dos reagentes por reação foram de 5 µl tampão 10X para PCR, 5µl dNTP Mix (0,2 mM de cada), 5 µl (2,5 mM) de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada *primer* (27F e 1492R), 1,25 u (0,25 µl) de *Taq* DNA Polimerase e água Mili-Q para completar a reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycler*® nas seguintes condições de temperaturas e duração: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min., 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 s), anelamento (55 °C por 40 s), extensão (72 °C por 1 min e 30 s) e uma extensão final de 72 °C por 7 min. 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 (Coreia), para sequenciamento e purificação.

As sequências selecionadas possuíam valores de qualidade maior que 20 e foram comparadas com as sequências do *GenBank* utilizando *Basic Local Alignment Search Tool* (NCBI). Somente sequências com mais de 1300 pb foram usadas para análise filogenético. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *neighbour-joining* usando o parâmetro modelo Kimura's 2 (KIMURA, 1980). Uma análise *bootstrap* foi realizada com 1.000 replicações.

### 3.5 Testes fenotípicos

Para os seguintes testes fenotípicos, assim como no sequenciamento, foram consideradas as estirpes que estabeleceram simbiose com o siratro e as “estirpes companheiras” dos nódulos, caso houvesse mais de uma estirpe bacteriana com diferente característica morfológica, além da nodulífera comprovada, dentro do mesmo nódulo.

#### 3.5.1 Teste de produção de hormônio de crescimento vegetal - Auxina (ácido – 3- indol acético ou AIA)

Nesse teste, além das estirpes citadas acima, foi testada uma estirpe como controle positivo de produção de AIA, *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>) (RADWAN; MOHAMED; REIS, 2002). Para isso, as estirpes isoladas nesse estudo foram crescidas em meio “79” líquido e sem o corante azul de bromotimol. Já a estirpe utilizada como controle, *A. brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>) foi crescida em meio *Dygs* (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986). Após o crescimento das estirpes, ajustou-se a densidade óptica (DO) para 0,5 com o auxílio da escala Mc Farland nº 2 para comparação, acrescentando solução salina (0,85%) para atingir a turbidez desejada. Dessa

padronização alíquotas de 500 µL de solução bacteriana foram inoculadas em 20 mL de meio “79” (sem triptofano e com 100 mg.L<sup>-1</sup> de triptofano). Foram incubadas por 72 horas sob agitação constante.

A concentração de AIA foi estimada no sobrenadante das culturas após a incubação. As células foram centrifugadas a 18.928 g por 10 min, em seguida retirou-se três mL do sobrenadante e adicionou-se dois mL do Reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995), reservando o material por 30 minutos no escuro para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de AIA.

A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535nm, segundo Asghar et al. (2002). A concentração do ácido indolacético foi estimada utilizando uma curva padrão previamente obtida pela adição de quantidades conhecidas de AIA (Sigma) 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 µM, de acordo com a equação  $y = 0,0053x + 0,675$  ( $R^2 = 0,97$ ).

Os dados foram analisados utilizando o programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2008) utilizando o teste Scott-Knott (5%). Todos os ensaios foram conduzidos em DIC com três repetições.

### **3.5.2 Teste de solubilização de fosfato de Cálcio e Alumínio**

As estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de solubilizar fosfatos de cálcio e alumínio em meio de cultura, juntamente com o controle positivo de solubilização UFLA 03-09 *Acinetobacter* sp (MARRA et al., 2011). O meio utilizado para a solubilização de fosfato de cálcio foi o NBRIP descrito em Nautiyal (1999), contendo (L<sup>-1</sup>): glicose 10g; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 g; KCl 0,2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 g e ágar 15g. A capacidade de solubilização de fosfato de alumínio foi avaliada em meio GES contendo: glicose 10 g L<sup>-1</sup>; extrato de solo 100 mL L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> (10%) 2 mL L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>

(1%) 2 mL L<sup>-1</sup>; NaCl 1 mL L<sup>-1</sup>; solução de micronutrientes 2 ml (Ca<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,235 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,28 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,008 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,024 g; dissolvida em 200 mL de água destilada); Fe-EDTA (1,64%) 4 mL L<sup>-1</sup>; KNO<sub>3</sub> 0,1 g L<sup>-1</sup>; ágar 15 g L<sup>-1</sup>, acrescido de 3,04 g L<sup>-1</sup> de AlH<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>, e pH ajustado para 4,5 (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Em cada placa de Petri com 9,5 cm de diâmetro foi adicionado 20 mL de meio NBRIP e GES, separadamente.

Para obtenção do inóculo, as estirpes foram crescidas em meio “79” líquido sem o corante azul de bromotimol e padronizados da mesma forma que foi feito para o teste de produção de AIA. Foram aplicados 20 µL de suspensão bacteriana em quatro pontos equidistantes na placa já contendo o meio com o fosfato precipitado, e para cada estirpe foram utilizadas duas placas, totalizando oito repetições. As placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias, e ao final desse período foi medido o diâmetro do halo de solubilização (área translúcida em torno da colônia), utilizando-se paquímetro digital. A partir dessas medidas foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) = Ø halo (mm) / Ø Colônia (mm), classificando as estirpes como de baixa (IS < 2 mm) ou intermediário (2 ≤ IS < 4,0 mm) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização, segundo Berraquero, Baya e Cormenzana (1976).

### 3.5.3 Resistência a antibióticos

O teste de resistência aos 15 diferentes antibióticos (Ácido Nalidíxico 30 µg - NAL, Amoxicilina 10 µg – AMO, Azitromicina 15 µg – AZI, Cefadroxil 30 mcg – CFD, Ceftriaxona 30 µg - CRO, Claritromicina 15 µg – CLA, Clorafenicol 30 µg – CLO, Eritromicina 15 µg – ERI, Estreptomicina 10 µg – EST, Kanamicina 30 µg – KAN, Oxacilina 1 µg – OXA, Rifamicina 30 µg – RFM, Vancomicina 30 µg – VAN, Ampicilina 10 µg – AMP, Gentamicina 10

$\mu\text{g}$  – GEN) (Cecon®, Brasil), foi avaliado pela técnica de difusão dos discos impregnados, sobrepostos em placas de Petri contendo meio “79”.

O inóculo das estirpes foi preparado da mesma forma que para os testes de produção de AIA e solubilização de fosfato, sendo que 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana foram espalhadas em placas de Petri contendo o meio “79”. Em seguida, três discos impregnados com o mesmo antibiótico foram dispostos nas placas e mantidos espaçados uns dos outros para evitar sobreposição dos halos de inibição. Após o crescimento, foi verificado se houve ou não inibição do crescimento bacteriano pelo antibiótico testado, e os dados gerados pelo antibiograma foram armazenados em uma matriz onde “1” indica a resistência (+) e “0” a sensibilidade (-) das estirpes. A matriz de similaridade entre as estirpes foi inferida usando o programa *BioNumerics* versão 6.1 (Applied Maths, Sint Martens latem, Bélgica) utilizando-se o algoritmo UPGMA e posteriormente construído um dendograma com coeficiente de Jaccard.

#### **3.5.4 Teste de coinoculação**

Por último, realizou-se um experimento de coinoculação das estirpes isoladas e sequenciadas do mesmo nódulo. O experimento foi instalado da mesma forma que o para autenticação das estirpes, em frascos de vidro escuro com sementes de siratro, com duração de 40 dias, entre 31/08/11 a 10/10/11. Os tratamentos foram: dois controles sem inoculação de suspensão bacteriana (S/N e C/N), um controle positivo de nodulação com a estirpe UFLA 04-212 *B. japonicum*, sete coinoculações que consistem de estirpes bacterianas nodulíferas e endofíticas não nodulíferas provenientes de sete nódulos diferentes, denominados nódulos A, B, C, D, E, F e G, e as 20 estirpes das coinoculações testadas separadamente.

As coinoculações dos nódulos A, D e F consistem, cada uma, em duas estirpes bacterinas com diferentes características morfológicas; as coinoculações dos nódulos B e C consistem em quatro estirpes, cada inoculação; e as coinoculações do nódulo E e G consistem em três estirpes.

As estirpes selecionadas foram crescidas em meio “79” líquido, por cinco dias sob agitação. Os tratamentos que possuíam menos de quatro estirpes para coinocular, o inóculo foi completado para 4 mL com meio “79” sem bactéria, para padronização no momento do plantio e inoculação, pois houve coinoculação com até quatro estirpes, totalizando nesse caso 4 mL de inóculo de quatro estirpes diferentes. O experimento foi conduzido por 40 dias com três repetições por tratamento em DIC. Após esse período, foram avaliados o NN, MSN, MSPA, MSR e Efr.

Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Captura, isolamento e caracterização fenotípica das estirpes bacterianas

No experimento de captura das BNL utilizando o siratro como planta-isca, não foi verificado nodulação nos dois tratamentos sem inoculação, sem nitrogênio mineral e com nitrogênio mineral, comprovando a ausência de contaminação no experimento.

No gráfico 1 está representado o número de estirpes bacterianas obtido por nódulo. No total foram obtidos 104 nódulos, sendo que em 47% dos nódulos obteve-se apenas uma única estirpe bacteriana. No entanto, observa-se que houve nódulos com mais de uma estirpe, sendo obtido até seis estirpes com características fenotípicas diferentes entre si. Isso demonstra que pode haver bactérias endofíticas dentro do nódulo as quais podem desenvolver funções diversas, como solubilização de fosfatos, produção de hormônios, entre outras.

Nossos dados corroboram com de outros autores que isolaram estirpes endofíticas de nódulo de soja (LI et al., 2008) ou que provaram a coexistência de bactéria nodulífera e endofítica num mesmo nódulo, utilizando técnica com marcador fluorescente, reisolamento das estirpes dos nódulos, eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e amplificação de genes simbióticos (WANG et al., 2006), além de trabalho que relatou a coexistência de BNL pertencentes aos gêneros *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp. e *Rhizobium* sp., em nódulos de *Mimosa* spp. (BARRET; PARKER, 2006), entre outros (IBÁÑEZ et al., 2009; KAN et al., 2007; MURESU et al., 2008; STAJKOVIĆ et al., 2009).

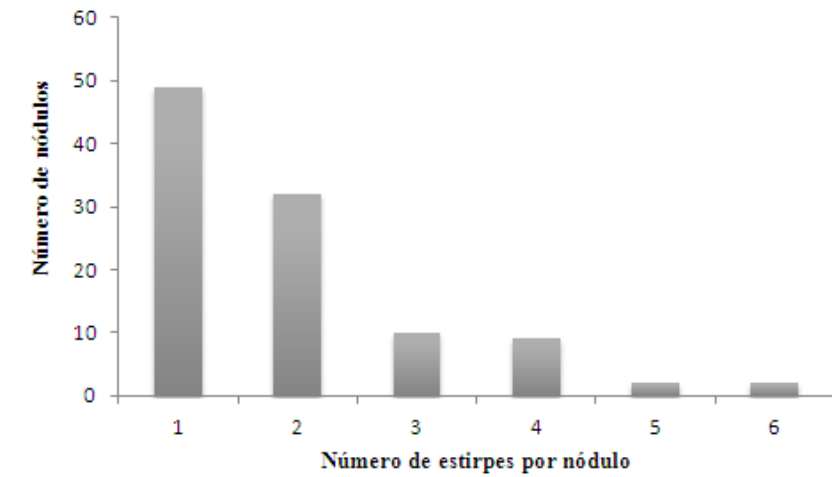


Gráfico 1 Número de nódulos com 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 estirpes

#### 4.2 Experimentos para autenticação de bactérias nodulíferas

Foram selecionadas, aleatoriamente, 96 (47%) estirpes com diferentes características morfológicas, do total de 203 estirpes isoladas de nódulos de siratro, para verificar a capacidade nodulífera. Dessas, apenas 16 estirpes (16,6%) foram capazes de formar nódulos. Não houve formação de nódulos nos controles negativos de nodulação (com nitrogênio e sem nitrogênio), o que indica que não ocorreu contaminação nos experimentos. Nas tabelas 3, 4, 5 e 6, estão representados os valores de número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e eficiência relativa das plantas de siratro inoculadas com as estirpes nodulíferas. O controle positivo de nodulação utilizado, UFLA 04-212, nodulou eficientemente, concordando com trabalho anterior (FLORENTINO et al., 2009) e indicando que as condições eram favoráveis para expressão da nodulação e FBN.

Tabela 4 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raiz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 01/09/10 a 10/10/10 (40 dias)

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>
		mg	g	g	%
Com N mineral	0 (c)	0 (d)	0,770 (a)	0,673 (a)	100,00 (a)
UFLA 04-286	18,66 (a)	36 (a)	0,070 (e)	0,050 (f)	9,22 (g)
UFLA 04-280	14 (b)	10 (c)	0,450 (b)	0,306 (b)	58,09 (b)
UFLA 04-212*	14 (b)	23 (b)	0,240 (c)	0,150 (d)	30,73 (c)
UFLA 04-322	0 (c)	0 (d)	0,160 (d)	0,163 (d)	20,52 (d)
UFLA 04-323	0 (c)	0 (d)	0,160 (d)	0,216 (c)	20,21 (d)
Sem N mineral	0 (c)	0 (d)	0,150 (d)	0,173 (d)	19,48 (d)
UFLA 04-324	0(c)	0 (d)	0,146 (d)	0,196 (c)	18,91 (d)
UFLA 04-325	0 (c)	0 (d)	0,146 (d)	0,160 (d)	18,87 (d)
UFLA 04-326	0(c)	0 (d)	0,143 (d)	0,163 (d)	18,57 (d)
UFLA 04-327	0 (c)	0 (d)	0,146 (d)	0,176 (d)	18,52 (d)
UFLA 04-328	0 (c)	0 (d)	0,143 (d)	0,150 (d)	18,52 (d)
UFLA 04-329	0(c)	0 (d)	0,140 (d)	0,140 (d)	18,44 (d)
UFLA 04-330	0(c)	0 (d)	0,143 (d)	0,156 (d)	18,35 (d)
UFLA 04-331	0 (c)	0 (d)	0,140 (d)	0,143 (d)	18,26 (d)
UFLA 04-332	0 (c)	0 (d)	0,143 (d)	0,210 (c)	18,18 (d)
UFLA 04-333	0 (c)	0 (d)	0,136 (d)	0,180 (d)	17,79 (d)
UFLA 04-335	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,200 (c)	17,44 (e)
UFLA 04-336	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,173 (d)	17,40 (e)
UFLA 04-340	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,156 (d)	17,23 (e)
UFLA 04-341	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,173 (d)	17,22 (e)
UFLA 04-342	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,196 (c)	17,18 (e)
UFLA 04-343	0 (c)	0 (d)	0,130 (d)	0,200 (c)	17,01 (e)
UFLA 04-344	0 (c)	0 (d)	0,133 (d)	0,160 (d)	16,92 (e)
UFLA 04-320	0 (c)	0 (d)	0,123 (d)	0,166 (d)	16,45 (e)
UFLA 04-346	0 (c)	0 (d)	0,126 (d)	0,173 (d)	16,40 (e)
UFLA 04-347	0 (c)	0 (d)	0,126 (d)	0,140 (d)	16,32 (e)
UFLA 04-348	0 (c)	0 (d)	0,130 (d)	0,163 (d)	16,23 (e)
UFLA 04-349	0 (c)	0 (d)	0,123 (d)	0,126 (d)	15,84 (e)
UFLA 04-350	0 (c)	0 (d)	0,116 (d)	0,153 (d)	15,19 (e)
UFLA 04-351	0 (c)	0 (d)	0,110 (d)	0,190 (c)	14,37 (f)

Tabela 4, continua...

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>
		mg	g	g	%
UFLA 04-352	0 (c)	0 (d)	0,100 (e)	0,170 (d)	12,94 (f)
UFLA 04-353	0 (c)	0 (d)	0,090 (e)	0,120 (d)	11,69 (f)
UFLA 04-354	0 (c)	0 (d)	0,080 (e)	0,136 (d)	10,13 (g)

\*Estirpe controle positivo de nodulação em siratro. <sup>(1)</sup>NN: número de nódulos; <sup>(2)</sup>MSN: matéria seca do nódulo; <sup>(3)</sup>MSPA: matéria seca da parte aérea; <sup>(4)</sup>MSR: matéria seca da raiz; <sup>(5)</sup> Efr:Eficiência relativa, Efr = MSPA(tratamento)x100/MSPA(C/N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 4,14 - NN; 0,13 - MSN; 0,60 - MSPA; 13,14 - MSR; 4,10 – Efr.

Tabela 5 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raiz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 24/09/10 a 03/11/10 (40 dias)

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>
		mg	g	g	%
Com N mineral	0 (f)	0 (f)	0,620 (a)	0,486 (a)	100,00 (a)
UFLA 04-306	25,33 (a)	83 (a)	0,450 (b)	0,223 (b)	72,47 (b)
UFLA 04-311	12,33 (e)	60 (d)	0,430 (b)	0,156 (d)	69,35 (b)
UFLA 04-212*	18,33 (c)	66 (c)	0,423 (b)	0,220 (b)	68,44 (b)
UFLA 04-282	12,00 (e)	76 (b)	0,383 (c)	0,186 (c)	61,45 (c)
UFLA 04-289	14,66 (d)	16 (e)	0,130 (d)	0,070 (g)	20,80 (d)
UFLA 04-356	0 (f)	0 (f)	0,163 (f)	0,190 (c)	26,29 (d)
UFLA 04-357	0(f)	0(f)	0,143 (f)	0,116 (e)	23,84 (d)
UFLA 04-358	0 (f)	0 (f)	0,140 (f)	0,133 (d)	23,17 (d)
UFLA 04-359	0 (f)	0 (f)	0,143 (f)	0,143 (d)	22,36 (d)
UFLA 04-360	0 (f)	0 (f)	0,133 (f)	0,143 (d)	21,50 (d)
UFLA 04-361	0 (f)	0 (f)	0,133 (f)	0,133 (d)	21,45 (d)
UFLA 04-362	0 (f)	0 (f)	0,130 (f)	0,140 (d)	21,29 (d)
UFLA 04-363	0(f)	0(f)	0,130 (f)	0,116 (e)	21,18 (d)
UFLA 04-364	0 (f)	0 (f)	0,133 (f)	0,140 (d)	21,18 (d)
UFLA 04-365	0 (f)	0 (f)	0,126 (f)	0,116 (e)	20,91 (d)
UFLA 04-366	0 (f)	0 (f)	0,126 (f)	0,126 (e)	20,70 (d)
UFLA 04-319	0 (f)	0 (f)	0,130 (f)	0,130 (e)	20,64 (d)
UFLA 04-368	0 (f)	0 (f)	0,130 (f)	0,090 (f)	20,53 (d)
UFLA 04-369	0 (f)	0 (f)	0,130 (f)	0,133 (d)	20,37 (d)
UFLA 04-370	0(f)	0(f)	0,126 (f)	0,116 (e)	20,27 (d)
UFLA 04-371	0 (f)	0 (f)	0,123 (f)	0,130 (e)	20,05 (d)
UFLA 04-372	0 (f)	0 (f)	0,123 (f)	0,120 (e)	19,84 (d)
UFLA 04-373	0 (f)	0 (f)	0,126 (f)	0,113 (e)	19,78 (d)
UFLA 04-374	0 (f)	0 (f)	0,123 (f)	0,116 (e)	19,73 (d)
UFLA 04-295	0 (f)	0 (f)	0,120 (f)	0,150 (d)	19,57 (d)
UFLA 04-375	0(f)	0(f)	0,120 (f)	0,090 (f)	19,30 (d)
UFLA 04-376	0 (f)	0 (f)	0,120 (f)	0,126 (e)	19,24 (d)
UFLA 04-377	0 (f)	0 (f)	0,110 (g)	0,086 (f)	17,95 (d)
UFLA 04-378	0 (f)	0 (f)	0,086 (g)	0,116 (e)	13,87 (e)
UFLA 04-379	0 (f)	0 (f)	0,083 (g)	0,103 (f)	13,44 (e)

\*Estirpe controle positivo de nodulação em siratro. <sup>(1)</sup>NN: número de nódulos; <sup>(2)</sup>MSN: matéria seca do nódulo; <sup>(3)</sup>MSPA: matéria seca da parte aérea; <sup>(4)</sup>MSR: matéria seca da raiz; <sup>(5)</sup> Efr:Eficiência relativa,  $Efr = \frac{MSPA(\text{tratamento}) \times 100}{MSPA(C/N)}$ . Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 4,81 - NN; 0,18 - MSN; 0,78 - MSPA; 0,57 - MSR; 4,31 – Efr.

Tabela 6 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raiz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 05/11/10 a 15/12/10 (40 dias)

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>
		mg	g	g	%
Com N mineral	0 (e)	0 (d)	0,790 (a)	0,370 (a)	100,00 (a)
UFLA 04-307	29,33 (b)	60 (a)	0,383 (b)	0,210 (b)	48,18 (b)
UFLA04-294	36,33 (a)	0,063 (a)	0,360 (b)	0,133 (c)	45,57 (b)
UFLA 04-212*	8,00 (a)	0,053 (b)	0,356 (b)	0,100 (c)	45,36 (b)
UFLA 04-285	16,00 (c)	56 (b)	0,310 (c)	0,130 (c)	39,36 (c)
UFLA 04-289	12,00 (d)	36 (c)	0,216 (d)	0,133 (c)	27,42 (d)
UFLA 04-380	0 (e)	0 (d)	0,146 (e)	0,110 (c)	18,56 (e)
Sem N mineral	0 (e)	0 (d)	0,143 (e)	0,133 (c)	18,06(e)
UFLA 04-381	0 (e)	0 (d)	0,143 (e)	0,150(c)	17,93 (e)
UFLA 04-382	0 (e)	0 (d)	0,140 (e)	0,133 (c)	17,72 (e)
UFLA 04-383	0 (e)	0 (d)	0,140 (e)	0,110 (c)	17,59 (e)
UFLA 04-384	0 (e)	0 (d)	0,130 (e)	0,130 (c)	16,37 (e)
UFLA 04-385	0 (e)	0 (d)	0,130 (e)	0,123 (c)	16,33 (e)
UFLA 04-386	0 (e)	0 (d)	0,126 (e)	0,130 (c)	15,86 (e)
UFLA 04-387	0 (e)	0 (d)	0,123 (f)	0,140 (c)	15,57 (e)
UFLA 04-388	0 (e)	0 (d)	0,120 (f)	0,113 (c)	15,14 (f)
UFLA 04-389	0 (e)	0 (d)	0,110 (f)	0,120 (c)	14,09 (f)
UFLA 04-390	0 (e)	0 (d)	0,110 (f)	0,103 (c)	13,79 (f)
UFLA 04-391	0 (e)	0 (d)	0,110 (f)	0,113 (c)	13,63 (f)
UFLA 04-392	0 (e)	0 (d)	0,100 (f)	0,110 (c)	12,70(f)

\*Estirpe controle positivo de nodulação em siratro. <sup>(1)</sup>NN: número de nódulos; <sup>(2)</sup>MSN: matéria seca do nódulo; <sup>(3)</sup>MSPA: matéria seca da parte aérea; <sup>(4)</sup>MSR: matéria seca da raiz; <sup>(5)</sup> Efr:Eficiência relativa, Efr = MSPA(tratamento)x100/MSPA(C/N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 9,88 - NN; 0,17 - MSN; 0,69 - MSPA; 1,02 - MSR; 3,81 - Efr.

Tabela 7 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raiz (MSR) e eficiência relativa (Efr) das estirpes de promover o crescimento vegetal de siratro em comparação ao tratamento com N, no período de 31/03/11 a 10/05/11 (40 dias)

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>
		mg	g	g	%
Com N mineral	0 (f)	0 (h)	0,700 (a)	0,456 (a)	100 (a)
UFLA 04-317	12 (d)	43 (c)	0,280 (b)	0,110 (h)	39,59 (b)
UFLA 04-303	15 (c)	50 (b)	0,260 (c)	0,216 (c)	36,72 (c)
UFLA 04-212*	14 (c)	30 (f)	0,256 (c)	0,233 (b)	36,68 (c)
UFLA 04-318	28 (a)	36 (e)	0,250 (c)	0,196 (d)	36,10 (c)
UFLA 04-305	18 (b)	40 (d)	0,230 (d)	0,166 (e)	33,33 (d)
UFLA 04-302	11 (e)	60 (a)	0,216 (d)	0,123 (g)	30,85 (e)
UFLA 04-301	10 (e)	20 (g)	0,193 (e)	0,040 (j)	27,79 (f)
UFLA 04-393	0 (f)	0 (h)	0,130 (f)	0,150 (f)	18,81 (g)
UFLA 04-394	0 (f)	0 (h)	0,126 (f)	0,136 (g)	18,00 (g)
Sem N mineral	0 (f)	0 (h)	0,120 (f)	0,113 (h)	17,40 (h)
UFLA 04-395	0 (f)	0 (h)	0,120 (f)	0,126 (g)	16,95 (h)
UFLA 04-396	0 (f)	0 (h)	0,116 (f)	0,133 (g)	16,52 (h)
UFLA 04-397	0 (f)	0 (h)	0,116 (f)	0,130 (g)	16,52 (h)
UFLA 04-398	0 (f)	0 (h)	0,110 (f)	0,120 (h)	15,23 (h)
UFLA 04-399	0 (f)	0 (h)	0,103 (f)	0,100 (h)	14,80 (h)
UFLA 04-400	0 (f)	0 (h)	0,096 (g)	0,113 (h)	13,70(i)
UFLA 04-402	0 (f)	0 (h)	0,080 (h)	0,063 (i)	11,70 (j)
UFLA 04-403	0 (f)	0 (h)	0,073 (h)	0,106 (h)	10,31 (j)

\*Estirpe controle positivo de nodulação em siratro. <sup>(1)</sup>NN: número de nódulos; <sup>(2)</sup>MSN: matéria seca do nódulo; <sup>(3)</sup>MSPA: matéria seca da parte aérea; <sup>(4)</sup>MSR: matéria seca da raiz; <sup>(5)</sup> Efr:Eficiência relativa, Efr = MSPA(tratamento)x100/MSPA(C/N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 5,67 - NN; 0,13 - MSN; 0,60 - MSPA; 13,14 - MSR; 4,10 - Efr.

A baixa taxa de nodulação obtida nos experimentos de autenticação pode ser devida ao fato de que foram isoladas nesse estudo todas as estirpes provenientes do nódulo, tanto simbióticas quanto não simbióticas. Além disso, sabe-se que estirpes dos gêneros como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* possuem os genes responsáveis pela nodulação localizados em plasmídeos de alto peso



molecular, que podem ser perdidos em condições ambientais adversas, como altas temperaturas, tornando a capacidade nodulífera das estirpes desses gêneros mais instável. Levando isso em consideração, algumas de nossas estirpes testadas podem pertencer a esses gêneros e terem perdido também o gene responsável pela nodulação.

Outros trabalhos também apresentaram tal situação, da maioria das estirpes isoladas de nódulos não serem capazes de nodular outras espécies vegetais e nem os hospedeiros de origem (DE LAJUDIE et al., 1999; LI et al., 2008). Além disso, outro grupo de pesquisadores também observou que nódulos de espécies selvagens da Itália e Argélia, continham predominantemente estirpes de rizóbios não cultiváveis, que foram detectados apenas por amplificação do gene 16S DNA diretamente dos nódulos, além de verificarem a presença de diversas estirpes bacterianas endofíticas do nódulo, a qual foi comprovada por microscopia de imunofluorescência (MURESU et al., 2008).

As estirpes UFLA 04-394 e UFLA 04-394 se destacaram pelo fato de não terem nodulado o siratro, porém, promoveram uma eficiência relativa (em torno de 18%) maior que a planta controle sem inoculação e sem N mineral (17%). Apesar da pouca diferença, essas estirpes podem talvez contribuir com o crescimento vegetal por outros mecanismos que não a FBN.

#### **4.3 Sequenciamento do 16S DNA das estirpes nodulíferas autenticadas e endofíticas**

A tabela 8 lista todas as 16 estirpes comprovadas como nodulíferas e as 13 ‘companheiras’ dessas estirpes, ou seja, que foram isoladas do mesmo nódulo, totalizando 29 estirpes. As estirpes companheiras também foram submetidas ao teste para autenticação da nodulação e o resultado também se encontra na tabela 8.

Tabela 8 Identificação das estirpes, simbióticas e não simbióticas, isoladas de nódulos de siratro, baseada nas sequências mais similares encontradas no GenBank (NCBI)

Estirpe	Nódulo <sup>1</sup>	Número de pares de base	Sequência mais similar encontrada no <i>GenBank</i> (NCBI)			Capacidade nodulífera comprovada
			Espécie	% Similaridade	Código de acesso	
UFLA 04-286	-	1406	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	JQ771197	Sim
UFLA 04-310	A	895	<i>Bacillus</i> sp.	93	JQ771207	Não
UFLA 04-311	A	-	-	-	-	Sim
UFLA 04-289	-	1415	<i>Bradyrhizobium</i> sp	99	JQ771198	Sim
UFLA 04-312	B	1266	<i>Burkholderia</i> sp.	99	JQ771208	Sim
UFLA 04-295	B	1449	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99	JQ771202	Não
UFLA 04-282	B	1284	<i>Rhizobium</i> sp.	100	JQ771195	Sim
UFLA 04-290	B	1310	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ771199	Não
UFLA 04-285	-	1214	<i>Leifsonia</i> sp.	100	JQ771196	Sim
UFLA 04-280	C	1257	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	JQ771194	Sim
UFLA 04-288	C	1310	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ778976	Não
UFLA 04-293	C	1316	<i>Bacillus</i> sp.	100	JQ778977	Não
UFLA 04-287	C	1345	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ778975	Não

Tabela 8, continua...

Estirpe	Nódulo <sup>1</sup>	Número de pares de base	Sequência mais similar encontrada no <i>GenBank</i> (NCBI)			Capacidade nodulífera comprovada
			Espécie	% Similaridade	Código de acesso	
UFLA 04-307	D	1397	<i>Burkholderia</i> sp.	99	JQ771206	Sim
UFLA 04-296	D	1322	<i>Massilia</i> sp.	99	JQ771203	Não
UFLA 04-281	E	1317	<i>Burkholderia</i> sp.	99	JQ778974	Sim
UFLA 04-315	E	-	-	-	-	Não
UFLA 04-316	E	-	-	-	-	Não
UFLA 04-294	-	1249	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JQ771201	Sim
UFLA 04-292	F	1397	<i>Naxibacter</i> sp.	99	JQ771200	Não
UFLA 04-306	F	1218	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JQ778980	Sim
UFLA 04-301	-	1232	<i>Burkholderia</i> sp.	100	JQ778978	Sim
UFLA 04-305	-	1474	<i>Paenibacillus</i> sp.,	99	JQ771205	Sim
UFLA 04-317	-	1376	<i>Massilia</i> sp.	98	JQ771210	Sim
UFLA 04-318	G	-	-	-	-	Sim
UFLA 04-319	G	-	-	-	-	Não
UFLA 04-320	G	1328	<i>Bacillus</i> sp.	99	JQ771209	Não

Tabela 8, continua...

Estirpe	Nódulo <sup>1</sup>	Número de pares de base	Sequência mais similar encontrada no <i>GenBank</i> (NCBI)			Capacidade nodulífera comprovada
			Espécie	% Similaridade	Código de acesso	
UFLA 04-303	-	1359	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JQ771204	Sim
UFLA 04-302	-	1230	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JQ778979	Sim

<sup>1</sup>Nódulos que tiveram apenas uma estirpe isolada, não foram designados com letras; <sup>2</sup>AG: Agricultura, P: Pastagem, CN: Capoeira Nova.

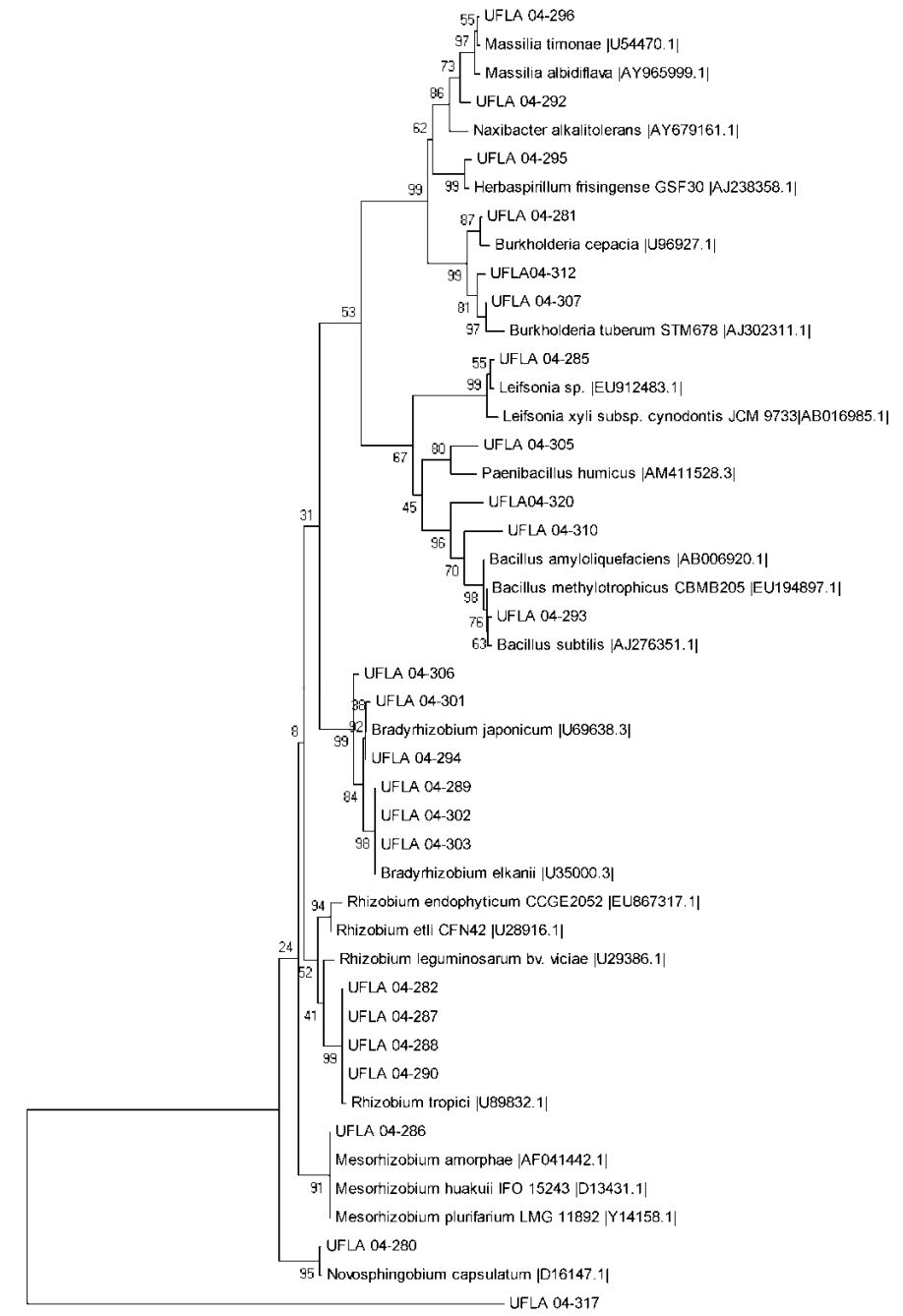


Figura 3 Árvore filogenética baseada no sequenciamento do gene 16S rDNA de estirpes nodulíferas e endofíticas provenientes de nódulos de siratro e estirpes referências. Nomenclatura em colchetes após o nome das estirpes refere-se ao número de acesso do banco de dados GenBank ou a designação da estirpe

#### 4.4 Produção de ácido-3-indol acético (AIA)

Foi avaliada a capacidade de produzir AIA pelas 29 estirpes, nodulíferas e endofíticas não nodulíferas, sendo que a maioria não apresentou produção de AIA quando cultivadas em meio sem adição de triptofano. Isso pode ser devido ao fato de não possuírem a via biossintética de AIA independente do triptofano, pois são conhecidas quatro vias de biossintese de AIA utilizadas pelas bactérias fixadoras de nitrogênio: índole-3-piruvato (IpyA), índole-3-acetamida (IAM) e triptamina (TAM), dependentes do aminoácido triptofano, e outra via independente do triptofano, cujo precursor é ainda desconhecido (LAMBRECHT et al., 2000; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

A produção do AIA variou de 0 a 54,68  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 9) em meio não suplementado com triptofano, e de 0 a 218,77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 10) em meio com 100 mg de triptofano por litro de meio de cultivo, sendo neste meio o nível mais alto produzido pela estirpe UFLA 04-287 *Rhizobium* sp.

Tabela 9 Produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelas estirpes isoladas de *Macropitium atropurpureum* cultivadas em meio 79 na ausência de triptofano

Estirpes <sup>1</sup>	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>2</sup>
UFLA 04-288 (C)	54,68 (a)
UFLA 04-287 (C)	9,34 (b)
UFLA 04-310 (A), UFLA 04-311 (A), UFLA 04-312 (B), UFLA 04-295 (B), UFLA 04-290 (B), UFLA 04-282 (B), UFLA 04-293 (C), UFLA 04-280 (C), UFLA 04-307 (D), UFLA 04-296 (D), UFLA 04-281 (E), UFLA 04-315 (E), UFLA 04-316 (E), UFLA 04-292 (F), UFLA 04-306 (F), UFLA 04-318 (G), UFLA 04-319 (G), UFLA 04-320 (G), UFLA 04-301, UFLA 04-303, UFLA 04-286, UFLA 04-305, UFLA 04-302, UFLA04-294, UFLA 04-317, UFLA 04-285, UFLA 04-289, BR 11001 <sup>T*</sup>	Não detecta do (c)

\*Estirpe padrão *Azospirillum brasiliense*. <sup>(1)</sup> Letra entre parênteses após a estirpe, indica de qual nódulo a estirpe foi isolada. <sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 5,13.

Tabela 10 Produção de ácido 3-indol acético (AIA) pelas estirpes isoladas de *Macrottilium atropurpureum* cultivadas em meio 79 na presença de triptofano

Estirpes <sup>1</sup>	AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>1</sup>
UFLA 04-287 (C)	218,77 (a)
UFLA 04-289	70,03 (b)
UFLA 04-311 (A)	40,66 (c)
UFLA 04-316 (E), UFLA 04-288 (C)	31,85 – 32,23 (d)
UFLA 04-280 (C)	25,06 (e)
BR 11001 <sup>T*</sup>	20,72 (f)
UFLA 04-285	7,32 (g)
UFLA 04-282 (B)	2,73 (h)
UFLA 04-310 (A), UFLA 04-312 (B), UFLA 04-295 (B), UFLA 04-290 (B), UFLA 04-293 (C), UFLA 04-307 (D), UFLA 04-296 (D), UFLA 04-281 (E), UFLA 04-315 (E), UFLA 04-306 (F), UFLA 04-292 (F), UFLA 04-318 (G), UFLA 04-319 (G), UFLA 04-320 (G), UFLA 04-302, UFLA04-294, UFLA 04-317, UFLA 04-303, UFLA 04-301, UFLA 04-286, UFLA 04-305,	Não detectado (i)

\*Estirpe padrão *Azospirillum brasiliense*. <sup>(1)</sup> Letra entre parênteses após a estirpe, indica de qual nódulo a estirpe foi isolada. <sup>(2)</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 4,02.

Pelo menos uma estirpe isolada dos nódulos A, B, C e E, foi capaz de produzir AIA na presença de triptofano, enquanto que nenhuma estirpe isolada dos nódulos D, F e G produziram AIA.

Das duas estirpes isoladas do nódulo A, UFLA 04-310 e UFLA 04-311 (Tabela 5), somente esta última foi autenticada e produziu AIA na quantidade de 40,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Também do nódulo B, a estirpe autenticada UFLA 04-282



*Rhizobium* sp. (Tabela 5) é quem foi capaz de produzir AIA ( $2,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). No entanto, no nódulo E, a estirpe que produziu AIA ( $31,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi a UFLA 04-316, a qual não nodulou o siratro. Todas essas estirpes produziram AIA somente em meio suplementado com triptofano.

As estirpes UFLA 04-287 *Rhizobium* sp. e UFLA 04-288 *Rhizobium* sp. provenientes do nódulo C, que não nodularam o siratro, produziram quantidades significativas de AIA na presença do aminoácido triptofano,  $218,77$  e  $32,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e foram as únicas estirpes que produziram AIA mesmo na ausência do aminoácido,  $9,34$  e  $54,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto a UFLA 04-287 *Rhizobium* sp. foi a qual apresentou maior valor de AIA produzido em meio com triptofano, a estirpe UFLA 04-288 *Rhizobium* sp. produziu mais AIA em meio sem triptofano. Ainda oriundos do mesmo nódulo, temos a estirpe UFLA 04-293 *Bacillus* sp. que não produziu AIA e não foi capaz de induzir nódulos em siratro, e a estirpe UFLA 04-280 *Sphingomonas* sp. que teve sua capacidade nodulífera autenticada (Tabela 4) e produziu  $25,06 \mu\text{g mL}^{-1}$  em meio suplementado com triptofano.

Da mesma forma que os resultados obtidos no presente estudo, Radwan, Mohamed e Reis (2002), também observaram que estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* apresentaram um aumento na produção de indóis com o aumento de triptofano no meio de cultivo. Sridevi e Mallaiah (2007), avaliando 26 estirpes isoladas de nódulos de *Sesbania sesban* (L.) Merr., quanto à produção de AIA em meio “79”, observaram que todas estirpes foram capazes de produzir AIA, sendo que 5 estirpes apresentaram maior produção quando suplementadas com apenas  $2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de triptofano, com valores de  $4,0$ ;  $12,0$ ;  $12,3$ ;  $16,2$  e  $28,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA.

Oliveira (2009) estudando estirpes simbióticas de feijão comum, caupi e siratro, obteve variação de apenas  $0,23$  a  $12,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio não suplementado com triptofano, e de  $0$  a  $42,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio com  $100 \text{ mg.L}^{-1}$

de triptofano, sendo que a estirpe UFLA04-0321 apresentou produção estatisticamente superior ( $42,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ao padrão positivo *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>), o qual apresentou  $37,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . No presente estudo, as estirpes UFLA 04-280 *Sphingomonas* sp., UFLA 04-287 *Rhizobium* sp., UFLA 04-288 *Rhizobium* sp., UFLA 04-289 *Bradyrhizobium* sp., UFLA 04-311 e a UFLA 04-316 também produziram teores de AIA superiores ao padrão positivo BR 11001<sup>T</sup> *A. brasilense*.

Essas estirpes produtoras de AIA podem ser mais estudadas a fim de averiguar a possibilidade de serem recomendadas como inoculantes, visando à promoção de crescimento pela produção de AIA, no entanto, deve ser respeitada a faixa de concentração de AIA benéfica para cada espécie de planta, pois como qualquer fito-hormônio, o excesso pode também afetar o desenvolvimento vegetal, além de valores muito baixos serem ineficazes (BISWAS et al., 2000).

#### 4.5 Solubilização de fosfato Cálcio e Alumínio

A capacidade solubilizadora de fosfato de Ca e Al também foi testada para as 29 estirpes em estudo. De acordo, com os valores obtidos para o IS, as estirpes foram classificadas em possuir IS baixo ( $\text{IS} < 2 \text{ mm}$ ) ou intermediário ( $2 \leq \text{IS} < 4,0 \text{ mm}$ ) (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). Nenhuma das estirpes foi capaz de solubilizar fosfato de alumínio, e nenhuma estirpe apresentou IS alto ( $\text{IS} \geq 4 \text{ mm}$ ) para solubilização de cálcio.

Das 29 estirpes em estudo, 18 (62%) não solubilizaram fosfato de cálcio, dez (34%) apresentaram IS baixo: UFLA 04-312, UFLA 04-301 *Bradyrhizobium* sp., UFLA 04-303 *Bradyrhizobium* sp., UFLA 04-302 *Bradyrhizobium* sp., UFLA 04-288 *Rhizobium* sp., UFLA 04-287 *Rhizobium* sp., UFLA 04-307 *Burkholderia* sp., UFLA 04-317 *Massilia* sp., UFLA 04-280 *Sphingomonas* sp. e UFLA 04-316, além da estirpe controle positivo de

solubilização de fosfato de cálcio UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.). Somente a estirpe UFLA 04-281 *Burkholderia* sp. apresentou IS intermediário (Tabela 11).

Nossos resultados estão de acordo com outros encontrados na literatura, como os obtidos por Marra et al. (2011), os quais avaliaram sete estirpes de BNL em relação à capacidade de solubilizar diferentes fontes de fosfato em meio sólido e líquido ao 15º dia após a inoculação, e os resultados do IS de  $\text{CaHPO}_4$  entre as estirpes também variaram de baixo a intermediário. No trabalho de Sridevi, Mallaiah e Yadav (2007), os ISs das estirpes de *Rhizobium* sp. testadas em meio sólido Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948) contendo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , também foram intermediários, variando de 2,4 a 2,7, e no trabalho de Hara e Oliveira (2005) as estirpes de rizóbios apresentaram baixo IS.

Tabela 11 Valores de IS e classificação das estirpes quanto à capacidade de solubilizar fosfato de Ca

Estirpe <sup>1</sup>	Valor IS	Classificação IS
UFLA 04-281 <i>Burkholderia</i> sp. (E)	2,34	INTERMEDIÁRIO
UFLA 04-312 (B)	1,72	BAIXO
UFLA 03-09 <i>Acinetobacter</i> sp.*	1,44	BAIXO
UFLA 04-302 <i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,34	BAIXO
UFLA 04-317 <i>Massilia</i> sp.	1,32	BAIXO
UFLA 04-301 <i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,20	BAIXO
UFLA 04-303 <i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,18	BAIXO
UFLA 04-288 <i>Rhizobium</i> sp. (C)	1,18	BAIXO
UFLA 04-307 <i>Burkholderia</i> sp. (D)	1,15	BAIXO
UFLA 04-287 <i>Rhizobium</i> sp. (C)	1,13	BAIXO
UFLA 04-280 <i>Sphingomonas</i> sp. (C)	1,09	BAIXO
UFLA 04-316 (E)	1,09	BAIXO

\*Estirpe controle <sup>(1)</sup> Letra entre parênteses após a estirpe, indica de qual nódulo a estirpe foi isolada.

Nenhuma das estirpes do nódulo A, F e G solubilizou fosfato de Ca. Do nódulo B, apenas a UFLA 04-312 foi capaz de solubilizar esse fosfato, a qual também nodulou o siratro. As mesmas estirpes provenientes do nódulo C que produziram AIA, também solubilizaram, UFLA 04-280 *Sphingomonas* sp, UFLA 04-287 *Rhizobium* sp. e UFLA 04-288 *Rhizobium* sp, sendo que somente a primeira nodulou o siratro. A estirpe do nódulo D que nodulou o siratro, UFLA 04-307 *Burkholderia* sp., também solubilizou fosfato de Ca. Das três estirpes obtidas do nódulo E, duas solubilizaram esse fosfato, sendo que uma delas não nodulou o siratro, porém produziu AIA (UFLA 04-316), e a outra comprovadamente nodulífera que não produziu AIA, no entanto foi a que apresentou maior IS (2,34 mm), a UFLA 04-281 *Burkholderia* sp,

Estudando bactérias endofíticas de nódulos de soja, Li et al. (2008) também encontrou estirpe de *Burkholderia* sp. CCBAU15508 solubilizadora de fosfato de Ca, além de *Serratia* sp. CCBAU15465 e *Pantoea* spp. CCBAU15488.

Os dados de Daimon et al. (2006) diferem dos obtidos neste trabalho, pois esses autores observaram que as estirpes de *Rhizobium* apresentaram maior capacidade em solubilizar fosfato de Ca em meio “79” suplementado com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , do que as estirpes de *Bradyrhizobium*, enquanto que no presente estudo, apesar de ambas estirpes apresentarem IS baixo, os valores de IS obtidos pelas estirpes UFLA 04-302 *Bradyrhizobium* sp., UFLA 04-301 *Bradyrhizobium* sp. e UFLA 04-303 *Bradyrhizobium* sp., foram maiores ou iguais aos valores apresentados pelas estirpes UFLA 04-288 *Rhizobium* sp. e UFLA 04-287 *Rhizobium* sp. Das estirpes com as quais Marra et al. (2011) trabalharam a de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) e *Bradyrhizobium japonicum* BR3267) e *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84), também foram capazes de solubilizar fosfato de Ca sendo que apenas a estirpe de *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 não solubilizou esse fosfato, porém solubilizou  $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$  em meio sólido GES.

Em relação à solubilização de fosfato de Al, poucas são as estirpes até então testadas que solubilizam esse fosfato. No estudo de Marra et al. (2011) os ISs para  $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$  foram menores quando comparados a  $\text{CaHPO}_4$ .

Estudos com microrganismos solubilizadores de fosfato são importantes, pois é conhecido que a inoculação em plantas com esses microrganismos favorece o crescimento vegetal por promover a absorção de nutrientes (CHABOT; ANTOUN; CESAS, 1996; KUCEY; JENZEN; LEGGETT, 1989), além de que o P estimula o crescimento rizóbios e a nodulação em leguminosas (MOREIRA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2010).

#### **4.6 Resistência a antibióticos**

Das 29 estirpes testadas, três estirpes não cresceram o suficiente na placa para formar ou não halo de inibição, por apresentarem produção escassa de exopolissacarídeos: UFLA 04-315, UFLA 04-319 e UFLA04-294. Portanto, foram testadas 26 estirpes em relação à resistência aos 15 antibióticos, das quais, as estirpes UFLA 04-293, UFLA 04-301 e UFLA 04-320 foram sensíveis a todos os antibióticos e as estirpes UFLA 04-317, UFLA 04-289, UFLA 04-288, UFLA 04-311 e UFLA 04-282, resistentes a 12 antibióticos, podendo apresentar então uma vantagem competitiva em relação às outras estirpes no solo (Figura 4).

A ordem crescente de antibióticos inibidores do crescimento das estirpes foi a seguinte: OXA < NAL e AMP < CRO < CLA e ERI < AMO < CFD e EST < CLO < AZI e VAN < GEN < RFM < KAN, isto é, Kanamicina foi o antibiótico mais eficiente na inibição do crescimento das estirpes neste estudo, apenas a estirpe UFLA 04-288 foi resistente a este antibiótico. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Frioni, Rodriguez e Meerhoff (2001) e Oliveira

(2009), nos quais também a maioria das estirpes foram mais sensíveis a RFM e KAN.

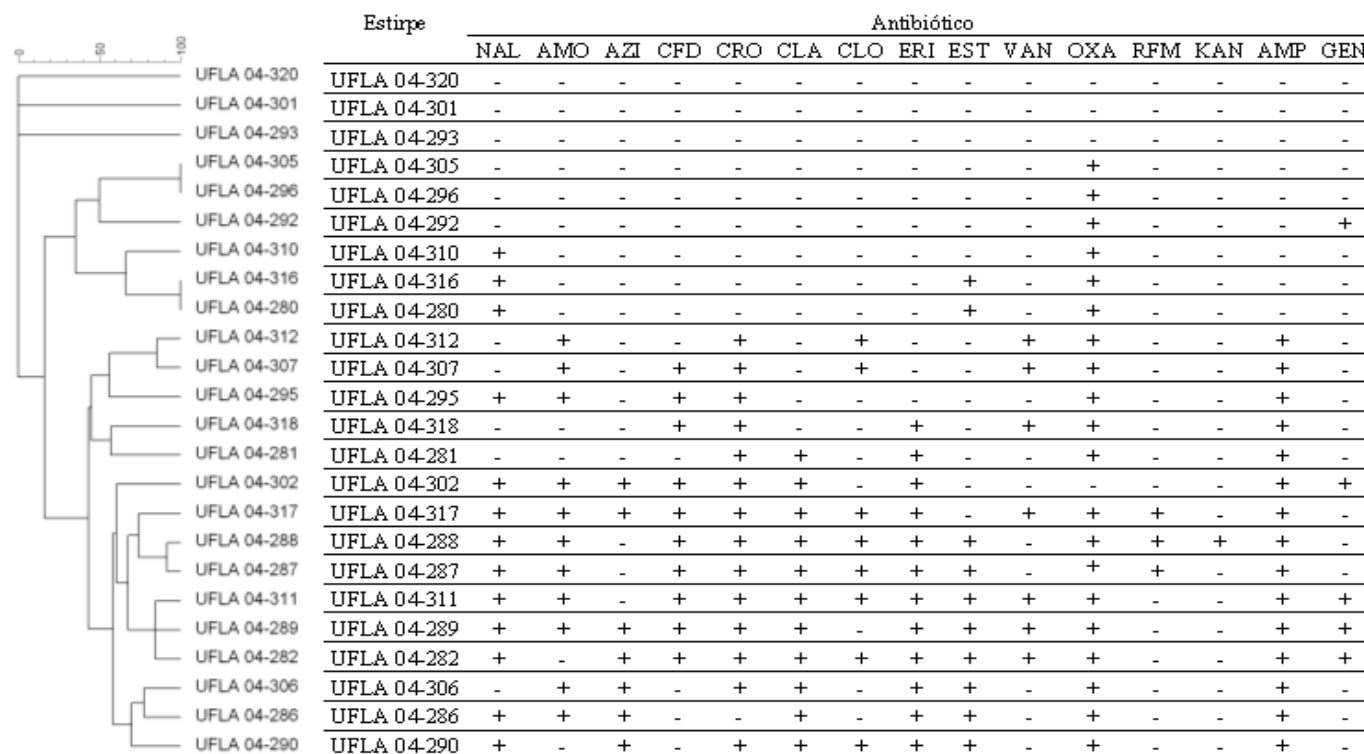


Figura 4 Resultado de resistência e sensibilidade das estirpes a diferentes antibióticos (“+” indica a resistência e “-” a sensibilidade)

#### 4.7 Teste de coinoculação

Comparando os resultados obtidos nesse teste de coinoculação de estirpes provenientes dos mesmos nódulos, com os resultados das estirpes inoculadas separadamente, podemos observar que nas coinoculações dos nódulos B e D, apesar dos NNs obtidos serem menores que o NN promovido pela estirpe nodulífera quando testada separadamente, as Efrs aumentaram nas coinoculações, podendo ser devido a um efeito sinérgico das outras estirpes endofíticas não nodulíferas quando coinoculadas com as estirpes nodulíferas.

Na coinoculação do nódulo A, não houve aumento no NN nem na Efr, em comparação com as estirpes testadas separadamente. No entanto, a Efr tanto desse caso quanto da coinoculação dos nódulos B e D, apresentaram Efrs superiores aos tratamentos “Sem N mineral” e ao controle positivo de nodulação UFLA 04-212 *B. japonicum*.

Nas outras coinoculações, não houve contribuição significativa das outras estirpes endofíticas dos nódulos no crescimento do siratro. As respectivas Efrs dos tratamentos C, E, F e G foram inferiores aos tratamentos controles sem N mineral e UFLA 04-212, apesar de ter ocorrido uma maior nodulação nos tratamentos G e F. Os tratamentos C e E não nodularam, assim como as estirpes provenientes desses nódulos testadas separadamente.



Tabela 12 Produção de Número de Nódulos (NN), Matéria Seca do Nódulo (MSN), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca da Raiz (MSR) das plantas de siratro coinoculadas com as estirpes bacterianas provenientes do mesmo nódulo (A, B, C, D, E, F e G) e das estirpes testadas isoladamente; Eficiência relativa (Efr) das estirpes em promover o crescimento vegetal e resultados dos testes fenotípicos realizados. Período do experimento: 31/08/11 a 10/10/11 (40 dias)

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup> mg	MSPA <sup>(3)</sup> g	MSR <sup>(4)</sup> g	Efr <sup>(5)</sup> %	Testes fenotípicos			
						AIA s/T $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIA c/T $\mu\text{g mL}^{-1}$	IS	Antib.
Com N mineral	0 (h)	0 (f)	0,743 (a)	0,270 (a)	100 (a)	_____			
<b>B</b>	<b>15,0 (f)</b>	<b>30 (a)</b>	<b>0,256 (b)</b>	<b>0,066 (e)</b>	<b>34,82 (b)</b>	_____			
UFLA04-312	20,0 (c)	20 (b)	0,120 (f)	0,090 (c)	16,35 (f)	nd	nd	B	6
UFLA04-295	0 (h)	0 (e)	0,113 (f)	0,083 (d)	15,31 (f)	nd	nd	ns	6
UFLA04-282	19 (c)	20 (b)	0,150 (e)	0,060 (e)	20,22 (e)	nd	2,73	ns	12
UFLA04-290	0 (h)	0 (e)	0,080 (h)	0,060 (e)	11,35 (g)	nd	nd	ns	9
<b>D</b>	<b>16,0 (e)</b>	<b>20 (b)</b>	<b>0,213 (c)</b>	<b>0,036 (g)</b>	<b>28,47 (c)</b>	_____			
UFLA04-307	19,3 (c)	20 (b)	0,163 (d)	0,040 (g)	21,98 (d)	nd	nd	B	7
UFLA04-296	0 (h)	0 (e)	0,100 (g)	0,073 (d)	14,37 (f)	nd	nd	ns	1

Tabela 12, continua...

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>	Testes fenotípicos			
						AIA s/T	AIA c/T	IS	Antib.
		mg	g	g	%	µg mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>		
<b>A</b>	<b>16,0 (e)</b>	<b>26 (a)</b>	<b>0,156 (d)</b>	<b>0,050 (f)</b>	<b>21,39 (d)</b>	—————			
UFLA04-310	22,0 (b)	20 (b)	0,160 (d)	0,060 (e)	21,62 (d)	nd	nd	ns	2
UFLA04-311	19 (c)	13 (c)	0,160 (d)	0,070 (d)	21,62 (d)	nd	40,66	ns	12
<b>Sem N mineral</b>	<b>0 (h)</b>	<b>0 (e)</b>	<b>0,140 (e)</b>	<b>0,103 (b)</b>	<b>18,65 (e)</b>	—————			
<b>UFLA04-212*</b>	<b>13,6 (g)</b>	<b>20 (b)</b>	<b>0,120 (f)</b>	<b>0,053 (f)</b>	<b>16,21 (f)</b>	—————			
<b>C</b>	<b>0 (h)</b>	<b>0 (e)</b>	<b>0,096 (g)</b>	<b>0,073 (d)</b>	<b>13,10 (g)</b>	—————			
UFLA04-280	0(h)	0 (e)	0,100 (g)	0,073 (d)	13,28 (g)	nd	25,06	B	3
UFLA04-288	0 (h)	0 (e)	0,140 (e)	0,100 (b)	18,96 (e)	54,68	32,23	B	12
UFLA04-293	0 (h)	0 (e)	0,150 (e)	0,103 (b)	20,31 (e)	nd	nd	ns	0
UFLA04-287	0 (h)	0 (e)	0,140 (e)	0,113 (b)	18,92 (e)	9,34	218,77	B	11

Tabela 12, continua...

Tratamentos	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(2)</sup>	MSPA <sup>(3)</sup>	MSR <sup>(4)</sup>	Efr <sup>(5)</sup>	Testes fenotípicos			
						AIA s/T	AIA c/T	IS	Antib.
		mg	g	g	%	µg mL <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>		
<b>G</b>	<b>23,0 (b)</b>	<b>10 (d)</b>	<b>0,086 (h)</b>	<b>0,033 (g)</b>	<b>11,48 (g)</b>				
UFLA04-318	20,3 (c)	20 (b)	0,173 (d)	0,053 (f)	23,55 (d)	nd	nd	ns	6
UFLA04-319	0 (h)	0 (e)	0,113(f)	0,100 (b)	15,45 (f)	nd	nd	ns	nc
UFLA04-320	0 (h)	0 (e)	0,100 (g)	0,066 (e)	13,96 (f)	nd	nd	ns	0
<b>E</b>	<b>0 (h)</b>	<b>0 (e)</b>	<b>0,076 (h)</b>	<b>0,080 (e)</b>	<b>10,31 (h)</b>				
UFLA04-281	0 (h)	0 (e)	0,120 (f)	0,103 (b)	15,90 (f)	nd	nd	I	5
UFLA04-315	0 (h)	0 (e)	0,130 (e)	0,100 (b)	17,11 (f)	nd	nd	ns	nc
UFLA04-316	0 (h)	0 (e)	0,096 (g)	0,073 (d)	12,97 (g)	nd	31,85	B	3
<b>F</b>	<b>25,6 (a)</b>	<b>30 (a)</b>	<b>0,063 (i)</b>	<b>0,056 (f)</b>	<b>8,38 (h)</b>				
UFLA04-306	17,3 (d)	13(c)	0,090 (h)	0,030 (g)	12,47 (g)	nd	nd	ns	8
UFLA04-292	0 (h)	0 (e)	0,100 (g)	0,063 (e)	13,51 (g)	nd	nd	ns	2

\*Estirpe controle positivo de nodulação em siratro. <sup>(1)</sup>NN: número de nódulos; <sup>(2)</sup>MSN: matéria seca do nódulo; <sup>(3)</sup>MSPA: matéria seca da parte aérea; <sup>(4)</sup>MSR: matéria seca da raiz; <sup>(5)</sup>Efr:Eficiência relativa, Efr. Efr=MSPA (tratamento)x100/MSPA(C/N). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 3,64 - NN; 0,12 - MSN;

7,48 - MSPA; 8,15 - MSR; 7,20 – Efr. Resultados dos testes fenotípicos das estirpes testadas separadamente foram incluídos na tabela para comparação: produção de ácido 3-indol acético (AIA) na presença (c/T) e na ausência (s/T) do aminoácido triptofano; Índice de Solubilização (IS) do fosfato de Ca; Antib.: Número de antibióticos testados que não inibiram o crescimento das estirpes.

Alguns trabalhos evidenciam a promoção no desenvolvimento vegetal devido à coinoculação de estirpes de rizóbios e estirpes não simbióticas (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; RAJENDRAN et al., 2008; SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006). A coinoculação com estirpes de *Paenibacillus polymyxa* e de *Bradyrhizobium* sp., proporcionou um aumento nas concentrações de cálcio, ferro e fósforo na matéria seca da parte aérea de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006). Foi relatado também um aumento no conteúdo de clorofila, crescimento e nodulação de ervilha d'Angola (*Cajanus cajan*), pela coinoculação de estirpes de *Bacillus* com *Rhizobium* spp. (RAJENDRAN et al., 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho e dados observados na literatura, reafirmam a importância de mais estudos relativos às interações entre as plantas e as estirpes endofíticas de nódulos, para que possam colaborar com a preservação da biodiversidade e melhoria nos nossos sistemas agrícolas e florestais.

## 5 CONCLUSÃO

Observou-se a presença de estirpes bacterianas com diferentes características morfológicas em nódulos diferentes da mesma planta. Além disso, foram isoladas mais de uma estirpe dentro de alguns nódulos, sendo essas estirpes simbióticas e não simbióticas.

Algumas dessas estirpes endofíticas, sendo elas nodulíferas ou não, apresentaram a capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato, podendo então contribuir com o crescimento vegetal, não apenas pelo fornecimento do Nitrogênio, mas também por outros mecanismos.

As estirpes estudadas foram capazes de resistir a diferentes antibióticos, podendo ter implicações práticas na seleção de novas estirpes que terão que sobreviver e colonizar o solo.

Essas estirpes são fontes interessantes de estudos para compreender as interações entre as plantas, estirpes simbióticas e não simbióticas, as funções que essas estirpes endofíticas desempenham para as diferentes hospedeiras e aplicação dessas isolados, previamente selecionados, em sistemas de produção agrícola.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, E.; PHAM, D.; STECK, T. R. The viable-but-Nonculturable Condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3754-3756, Aug. 1999.

ALIKHANI, H. A.; SALEN-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p. 35-41, 2006.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.

ANTOUN, H. A. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 204, p. 57-67, 1998.

ANYANGO, B. et al. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils of contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4016-4021, 1995.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/ *Bradyrhizobium elkani*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, set. 1999.

ANTOUN, H. A. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 204, p. 57-67, 1998.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.

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

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.

BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880-886, 2000.

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.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 184, p. 311-321, 1996.

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

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



CUMMINGS, S. P. et al. Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium* (*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 2510–2525, 2009.

DAIMON, H. et al. Tricalcium phosphate solubilizing by root nodule bacteria of *Sesbania cannabina* and *Crotalaria juncea*. **Plant Production Science**, Saitama, v. 9, p. 388-389, 2006.

DE LAJUDIE, P. et al. *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 22, p. 119–132, 1999.

DE LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, p. 1277-1290, 1998.

DE LAJUDIE, P. et al. 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**, Ames, v. 44, p. 715-733, 1994.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p

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

FIDALGO, E. C. et al. **Levantamento do uso da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: phase 1”**, município de Benjamin Constant (AM). Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 71).

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

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

FRANK, B. Ueber die Parasiten in den Wurzelan-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.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1928. 143p

FRIONI, L.; RODRIGUEZ, A.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 275-282, mar. 2001.

GAO, J. L. et al. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 155-168, 2001.

GAO, J. L. et al. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the

northern regions of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2003–2012, 2004.

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

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895–914, 1997.

HAN, S. Z.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 265–276, 2005.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Physiological and ecological characteristics of rhizobia isolates from acid soils of Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 667-672, 2005.

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

HOWIESON, J. G.; EWING, M. A.; D'ANTUONO, M. F. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 105, p. 179–188, 1988.

HOWIESON, J. G.; ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. Calcium modifies pH effects on the growth of acid-tolerant and acid-sensitive *Rhizobium meliloti*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 43, p. 765–772, 1992.

HUNG, P. Q. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 155–162, 2007.

IBÁÑEZ, F. et al. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, p. 49–55, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas e de vegetação**. 2004. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169)>. Acesso em: jan. 2012.

JARAMILLO, P. M. D. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob Agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**, 2010. 81 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 895-898, 1997.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.8, p.769-776, ago. 2005.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn. 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. B. **Manual of systematic bacteriology**. London: Willians and Wilkins, 1984. p. 234-244.

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

JOURAND, P. et al. *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**, Reading, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

KAN, F. L. et al. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 188, p. 103-115, 2007.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, p. 243-248, 1995.

KHBAYA, B. et al. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4912 – 4917, 1998.

KIMURA, M. A simple method of estimating evolutionary rate of base through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, Junho, 1980.

KUCEY, R. M. N.; JENZEN, H. H.; LEGGETT, M. E. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 42, p. 199–228, 1989.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 298–300, 2000.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: [s. n.], 1991. p. 115-148.

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

LIBA, C. M. et al. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 5, p. 1076-86, 2006.

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

LIN, D. X. et al. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LINU, M. S.; STEPHEN, J.; JISHA, M. S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 4, p. 79-87, 2009.

MACCIÒ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Activity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 201-208, 2002.

MANAHAN, S. H.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 29–38, 1997.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, Sept./Oct. 2011.

MCDUGALD, D. et al. Nonculturability: adaption or debilitation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 1-9, 1998.

MHAMDI, R. et al. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium* like strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 105–111, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; CARVALHO, T. S.; SIQUEIRA, J. O. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 771-779, 2010.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinerare* sp Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.). Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 197-206, 2006.

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

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 280 p.

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

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6840, p. 948-950, June 2001.

MRABET, M. et al. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 304-309, 2006.

MURESU, R. et al. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 383-400, 2008. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x/pdf>>. Acesso em: 25 out. 2011.

NANDASENA, K. G. et al. Phylogenetic relationships of three bacterial strains isolated from the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1983-1986, 2001.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Lucknow, v. 170, p. 265-270, 1999.

NAVARRETE, A. A. et al. Land-use systems affect archaeal community structure and functional diversity in western Amazon soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 35, p.1527-1540, 2011.

ODEE, D. W. et al. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 801-811, 2002.



OLIVEIRA, S. M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVER, J. D. et al. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 2624–2630, 1995.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 103-110, 2001.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital capacity of source microbial species. **Microbiologia**, Madrid, v. 17, p. 362-370, 1948.

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

RADAMBRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto Juruá: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra**. Rio de Janeiro, 1977. 436 p. (Levantamento de Recursos Minerais, 15).

RADWAN, T.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 32, p. 39-54, 2002.

RAJENDRAN, G. et al. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 4544-4550, 2008.

RIVAS, R. et al. 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**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Nov. 2002.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUES, T. E. Solos da Amazônia In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONJTES, M. P. F. (Ed.) **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. p. 19-60.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p. 261-269, 1995.

SILVA, K. **Identification and functional characterizaion of diazotrofic  $\beta$ -proteobacteria from brazilian soils**. 2009. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, M. A. P. **Diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas da região do Alto Solimões, AM**. 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 95-99, 2006.

SOMASEGARDEN, P.; HOLBEN, H. J. **Methods Legume–Rhizobium technology**. Paia: NifTAL Center, 1985.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, p. 425-448, 2007.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V. Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 1, n. 7, p. 125-128, 2007.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V.; YADAV, N. C. S. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. **Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 2, p. 635-639, 2007.

STAJKOVIĆ, O. et al. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica Serbica**, Belgrade, v. 33, n. 1, p. 107-114, 2009.

STURZ, A.V. et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 13–19, 1997.

SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214–220, 2001.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fósforo na rizosfera de gramíneas e

leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.

TAN, Z. Y. et al. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 874–879, 1997.

TOFFANIN, A. et al. Energy content decrease and viable-not-culturable status induced by oxygen limitation coupled to the presence of nitrogen oxides in *Rhizobium "hedysari"*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 484-488, 2000.

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. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 347-352, 1991.

VALVERDE, A. et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1985–1989, 2005.

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

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

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N. Application of *Rhizobium* BHURC01 and plant growth promoting Rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpeaa (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 5, n. 3, p. 148-156, 2010.

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

VINUESA, P. et al. *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.

WANG, L. L. et al. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 436-443, 2006.

WILLEMS, A. et al. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1207-1217, 2003.

XU, H. S. et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**, New York, v. 8, p. 313-323, 1982.

YADEGARI, M. H. A.; RAHMANI, G. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 5, n. 9, p. 792-799, 4 May 2010.

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

ZAVARZIN, G. A. Budding bacteria. **Microbiology**, New York, v. 30, p. 774–791, 1961.