

LUCAS DE PAULA MERA

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO QUE COLONIZAM
Macroptilium lathyroides (L.) Urb. E *Alysicarpus
vaginalis* DC.**

Dissertação de Mestrado

ALTA FLORESTA-MT

2019

| | | | |
|--|---------------------|----------------|-----------------|
| | | | |
| | LUCAS DE PAULA MERA | Diss. MESTRADO | PPGBioAgro 2019 |



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS
AMAZÔNICOS



LUCAS DE PAULA MERA

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO QUE COLONIZAM
Macroptilium lathyroides (L.) Urb. E *Alysicarpus
vaginalis* DC.**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
Coorientadora: Profa. Dra. Rayssa Pereira Vicentin
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira

ALTA FLORESTA-MT

2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação

Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

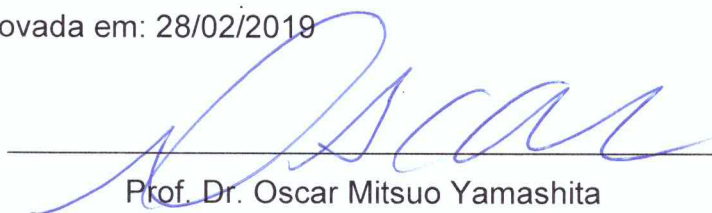
| | |
|-------|---|
| M552e | <p>MERA, Lucas de Paula . Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Que Colonizam <i>Macroptilium Lathyroides</i> (L.) Urb. e <i>Alysicarpus Vaginalis</i> Dc. / Lucas de Paula Mera - Alta Floresta, 2019. 111 f.; 30 cm.(ilustrações) Il. color. (sim)</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Câmpus de Alta Floresta, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2019. Orientador: Oscar Mitsuo Yamashita Coorientador: Rayssa Pereira Vicentin / Anderson Ferreira</p> <p>1. Bactérias Diazotróficas. 2. Feijão dos Arrozais. 3. Amendoinzinho. 4. Rizóbios. 5. Nodulação. I. Lucas de Paula Mera. II. Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Que Colonizam <i>Macroptilium Lathyroides</i> (L.) Urb. e <i>Alysicarpus Vaginalis</i> Dc.: .</p> <p>CDU 633.34</p> |
|-------|---|

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO QUE COLONIZAM
Macroptilium lathyroides (L.) Urb. E *Alysicarpus
vaginalis* DC.**

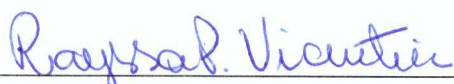
LUCAS DE PAULA MERA

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.

Aprovada em: 28/02/2019



Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita
Orientador – UNEMAT/ PPGBioAgro



Prof. Dra. Rayssa Pereira Vicentin
UNEMAT



Prof. Dr. Anderson Ferreira
EMBRAPA
Pesquisador Embrapa - CIBio 79028/01 - 0
Matrícula 352126 - SIApe 1840289



Prof. Dra. Ana Aparecida Bandini
Rossi
UNEMAT/ PPGBioAgro



Prof. Dra. Elaine Martins da Costa
Universidade Federal do Piauí

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, Jane Bernardete de Paula, minha irmã Dandara de Paula Donato, ao meu irmão Edinaldo Noah Mera, minha esposa Ana Carolina França Bogo, minha filha Helena Bogo Mera e aos meus Avós Rita Baggio de Paula e João Alves Maria de Paula.

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos PPGBioAgro, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - IFMT, por conceder o afastamento integral, que permitiu a realização do Programa de Mestrado.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agrossilvipastoril Sinop, pelo estágio e oportunidade de desenvolvimento de parte da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Oscar Mitsuo Yamashita pelo aprendizado, ensinamentos, pela paciência e amizade.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Rayssa Pereira Vicentin pelo aprendizado, ensinamentos, pela paciência e amizade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Anderson Ferreira pelo aprendizado, ensinamentos, pela paciência e amizade.

Ao Diego Cardoso, funcionário da secretaria do programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, pelo atendimento e presteza quando solicitado.

Aos colegas e amigos da turma de mestrado que adquiri durante essa jornada, em especial a Karla Bianca de Deus Bento.

A minha amada família, Ana Carolina França Bogo e Helena Bogo Mera.

Ao Edmar Santos Moreira pela ajuda na execução dos experimentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | viii |
| LISTA DE SIGLAS | ix |
| Resumo..... | 01 |
| Abstract..... | 02 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 04 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 06 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 16 |
| 3. CAPÍTULOS..... | 22 |
| 3.1. EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO QUE COLONIZAM <i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urb. | 22 |
| Resumo..... | 23 |
| Abstract..... | 24 |
| INTRODUÇÃO | 25 |
| MATERIAL E MÉTODO | 27 |
| Coleta de nódulos de <i>Macroptilium lathyroides</i> | 27 |
| Isolamento de estirpes de bactérias | 27 |
| Caracterização fenotípica | 28 |
| Características culturais..... | 28 |
| Agrupamento dos isolados por similaridade morfológica..... | 30 |

| | |
|--|----|
| Autenticação das estirpes..... | 30 |
| Identificação molecular das estirpes bacterianas | 33 |
| Teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio..... | 35 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 38 |
| Caracterização morfológica das colônias | 38 |
| Agrupamento dos isolados | 41 |
| Autenticação dos isolados | 45 |
| Sequenciamento 16SrDNA dos isolados de <i>M. lathyroides</i> | 49 |
| Teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio..... | 52 |
| CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| 3.2. EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE NÓDULOS DE <i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC..... | 64 |
| Resumo..... | 65 |
| Abstract..... | 66 |
| INTRODUÇÃO | 67 |
| MATERIAL E MÉTODO | 69 |
| Coleta de nódulos de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 69 |
| Isolamento de estirpes de bactérias | 69 |
| Caracterização fenotípica | 71 |
| Características culturais..... | 71 |
| Agrupamento dos isolados por similaridade morfológica..... | 72 |
| Autenticação dos isolados | 73 |

| | |
|---|-----|
| Identificação molecular dos isolados bacterianos..... | 75 |
| Teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio..... | 77 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 80 |
| Caracterização morfológica das colônias | 80 |
| Agrupamento dos isolados | 84 |
| Autenticação dos isolados | 88 |
| Sequenciamento do gene16SrDNA dos isolados de <i>A. vaginalis</i> | 93 |
| Teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio..... | 97 |
| CONCLUSÕES | 102 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |
| 4. CONCLUSÕES GERAIS | 111 |

LISTA DE TABELAS

| TABELAS | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1 | |
| 1. Concentração de nutrientes em solução nutritiva utilizada no experimento de autenticação de isolados de rizóbios obtidos de <i>Macroptilium lathyroides</i> | 31 |
| 2. Resultado da análise de solo utilizado no experimento de eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Análise realizada no laboratório de Análises de solo, Adubo e Foliar da Universidade do Estado de Mato Grosso – LASAF. | 36 |
| 3. Autovalores, quantidade de variação explicada, coeficientes de correlação e autovetores entre isolados de rizóbios de plantas de <i>Macroptilium lathyroides</i> | 43 |
| 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca total (MST), relação entre parte aérea e raiz (REL), de plantas de <i>Macroptilium lathyroides</i> inoculados com isolados de rizóbio. | 46 |
| 5. Identificação genética por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de raízes de <i>Macroptilium lathyroides</i> .. | 50 |
| 6. Tabela de análise de variância para os fatores comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) de plantas de <i>Macroptilium lathyroides</i> inoculadas com diferentes isolados..... | 52 |
| 7. Tabela de análise de variância para os fatores número de nódulos (Nº de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV), teor de nitrogênio (N) e conteúdo de nitrogênio (CONT N) de plantas de <i>Macroptilium lathyroides</i> inoculadas com diferentes isolados..... | 53 |

| | |
|--|----|
| 8. Número de nódulos (N° de nódulos e teor de nitrogênio (N) de plantas de <i>Macroptilium lathyroides</i> inoculadas com diferentes isolados, os valores de N estão expressos em gramas e para N gramas por quilo | 54 |
|--|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| 1. Concentração de nutrientes em solução nutritiva utilizada no experimento de autenticação de isolados de rizóbios obtidos de <i>Alyscarpus vaginalis</i> | 73 |
| 2. Resultado da análise de solo utilizado no experimento de eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Análise realizada no laboratório de Análises de solo, Adubo e Foliar da Universidade do Estado de Mato Grosso – LASAF. | 78 |
| 3. Autovalores, quantidade de variação explicada, coeficientes de correlação e autovetores entre isolados de rizóbios de plantas de <i>Alyscarpus vaginalis</i> | 86 |
| 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca total (MST), relação entre parte aérea e raiz (REL), de plantas de <i>Alyscarpus vaginalis</i> inoculados com isolados de rizóbio. | 88 |
| 5. Identificação genética por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA de isolados de nódulos de raízes de <i>Alyscarpus vaginalis</i> | 94 |
| 6. Tabela de análise de variância para os fatores comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) de plantas de <i>Alyscarpus vaginalis</i> inoculadas com diferentes isolados | 97 |
| 7. Relação entre parte aérea e raiz (RELAÇÃO) de plantas de <i>Alyscarpus vaginalis</i> inoculadas com isolados de rizóbios | 98 |
| 8. Tabela de análise de variância para os fatores número de nódulos (N° de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV), | |

| | |
|--|-----|
| teor de nitrogênio (N) e conteúdo de nitrogênio (CONT N) de plantas de <i>Alysicarpus vaginalis</i> inoculadas com diferentes isolados | 99 |
| 9. Número de nódulos (N° de nódulos) e teor de nitrogênio (N) de plantas de <i>Alysicarpus vaginalis</i> inoculadas com diferentes isolados, os valores de N estão expressos em gramas por quilo | 100 |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURAS | Página |
|---|--------|
| REVISÃO DE LITERATURA | |
| 1. <i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urb | 07 |
| 2. <i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) D.C. | 09 |
| 3. Raiz de <i>Macroptilium lathyroides</i> com nódulo..... | 11 |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1. Placa utilizada na caracterização de estirpes de nódulos de raízes de <i>Macroptilium lathyroides</i> , placa com isolado com 10 dias de crescimento..... | 29 |
| 2. Procedimento de inoculação de estirpes em <i>Macroptilium lathyroides</i> | 32 |
| 3. Termociclador T100ThermalCycler (BIO-RAD) utilizado para reação em cadeia Polimerase..... | 34 |
| 4. Visão geral das unidades experimentais no teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio de isolados em <i>Macroptilium lathyroides</i> | 36 |
| 5. Frequência de isolados por caracterização morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de <i>Macroptilium lathyroides</i> | 38 |
| 6. Dendrograma de isolados de rizóbio obtidos de raízes de <i>Macroptilium lathyroides</i> , por caracterização fenotípica e formação de grupos com características semelhantes, coletados no município de Alta Floresta – MT..... | 42 |

| | | |
|----|---|----|
| 7. | Gráfico biplot dos componentes principais 1 e 2 da análise de componentes principais com as características morfológicas referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultura de bactérias isoladas de raízes de <i>Macropitium lathyroides</i> | 43 |
| 8. | Eficiência relativa (ER) da produção de massa seca da parte aérea apresentada por plantas de <i>Macropitium lathyroides</i> inoculadas com isolados de rizóbio obtidos de raízes de <i>Macropitium lathyroides</i> em solos da região periurbana e rural do município de Alta Floresta – MT..... | 49 |

CAPÍTULO 2

| | | |
|----|--|----|
| 1. | Colônia pura isolada de nódulos de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 70 |
| 2. | Placa utilizada na caracterização de isolados de nódulos de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> , com 10 dias de crescimento | 71 |
| 3. | Vista geral do experimento de autenticação de isolados de nódulos de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 74 |
| 4. | Termociclador T100ThermalCycler (BIO-RAD) utilizado para reação em cadeia Polimerase..... | 76 |
| 5. | Vista geral do teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio de isolados de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 78 |
| 6. | Caracterização morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 81 |

| | | |
|----|--|----|
| 7. | Dendrograma de isolados de rizóbio obtidos de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> , por caracterização fenotípica e formação de grupos com características semelhantes, coletados no município de Alta Floresta – MT..... | 85 |
| 8. | Gráfico biplot dos componentes principais 1 e 2 da análise de componentes principais com as características morfológicas referentes ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultura de bactérias isoladas de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> | 87 |
| 9. | Eficiência relativa (ER) da produção de massa seca da parte aérea apresentada por plantas de <i>Alysicarpus vaginalis</i> inoculadas com isolados de rizóbio obtidos de raízes de <i>Alysicarpus vaginalis</i> em solos da região periurbana e rural do município de Alta Floresta – MT..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CTC capacidade de troca catiônica

°C Temperatura em graus Celsius

% Porcentagem

≤ Menor ou igual

cm Centímetros

ha Hectare

Log Logaritimo

mL Mililitro

mg L-1 Miligramas por litro

mm Milímetros

rpm rotações por minuto

SB soma de bases

s/d Sem data

V Saturação por bases

m Saturação por alumínio

μL microlitro

LISTA DE SIGLAS

B.O.D Biochemical Oxygen Demand

B Boro

Ca Cálcio

CaCl₂ 2H₂O Cloreto de cálcio dihidratado

Ca(NO₃)₂ 4H₂O Nitrato de cálcio

Cl Cloro

CONT N conteúdo de nitrogênio

Cu Cobre

CuCl₂ Cloreto de Cobre

c.v. Coeficiente de variação

DNA deoxyribonucleic acid

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ER Eficiência Relativa

FBN Fixação biológica de nitrogênio

Fe Ferro

IFMT Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

IV índice verde

K Potássio

KCl Cloreto de potássio

Kg Quilograma

KNO₃ Nitrato de potássio

KH₂ PO₄ Fosfato monopotássico

H₂MoO₄ Ácido Molibdico

H₃BO₃ Ácido Bórico

LaSem Laboratório de Sementes e Matologia

Mg Magnésio

MgSO₄ 7H₂O Sulfato de magnésio

Mn Manganês

MnCl₂ Fluoreto de magnésio

Mo Molibdênio

MSN Massa seca de nódulo

MSPA Massa seca da parte aérea

MSR Massa seca de raiz

MST Massa seca total

MT Mato Grosso

N Nitrogênio

N₂ Nitrogênio

NH₃ Amoníaco

NH₄⁺ Amônio

N° de nódulos número de nódulos

P Fósforo

P.A. Puro para análise

PCR Polymerase Chain Reaction

pH Escala numérica adimensional que indica acidez

PPGBioAGRO Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos

RELAÇÃO Relação parte aérea raiz

rpm Rotações por minuto

S Enxofre

UNEMAT Universidade do Estado de Mato Grosso

UPGMA Unweighted Pairgroup Mean Arithmetic Method

Zn Zinco

ZnCl₂ Cloreto de Zinco

Resumo – A *Alysicarpus vaginalis* e o *Macroptilium lathyroides* são leguminosas com incrível potencial para alimentação animal e enriquecimento de pastagens, apresentam nodulação abundante o que indica potencial na fixação biológica de nitrogênio e possível utilização como abubo verde. Assim sendo o objetivo do presente trabalho foi estudar a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam as espécies leguminosas *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. e *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. Para tanto, foram coletadas raízes das suas espécies vegetais em áreas de ocorrência natural das espécies na zona rural e periurbana do município de Alta Floresta-MT. As raízes que apresentaram nodulação foram lavadas e seus nódulos retirados, desinfestados e inoculados em meio de cultura 79 dentro de placas de Petri. Estas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) no escuro por 28 °C por 10 dias; após esse período, as colônias foram purificadas pelo método de esgotamento por estrias. A caracterização morfológica em placa foi realizada após o isolamento das estirpes e os dados foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência das características, sendo posteriormente utilizados para construção de um dendrograma de similaridade. Após esta etapa foi realizado o experimento de autenticação dos isolados nas duas espécies vegetais, os isolados que apresentaram elevada massa seca da parte aérea foram selecionados, em conjunto com os dados de agrupamento de isolados, para serem sequenciados, todos os isolados selecionados na autenticação foram submetidos ao teste de eficiência de fixação de N. O sequenciamento permitiu identificar as seguintes bactérias que colonizam raízes da espécie *M. lathyroides*: *Mucilaginibacter gossypicola*, *Novosphingobium arabidopsis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus xiamenensis*, *Bradyrhizobium namibiense* e *Flavobacterium anhuiense*. Os isolados M004, M005 e M022 apresentaram valores de teor de nitrogênio na planta muito próximos ao do tratamento com nitrogênio, sendo indicados para novos estudos. O sequenciamento do gene 16S rDNA, permitiu identificar as seguintes bactérias que colonizam raízes de *A. vaginalis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus*, e *Paenibacillus catalpae*. As estirpes A018, A027 e A051 apresentam potencial para novos estudos, apenas a estirpe A051 apresentou teor de N elevado na planta.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, feijão dos arrozais, amendoimzinho, rizóbios, nodulação.

Abstract - *Alysicarpus vaginalis* and *Macroptilium lathyroides* are legumes with incredible potential for animal feeding and enrichment of pastures, present abundant nodulation indicating potential in the biological fixation of nitrogen and possible use as green abubo. Thus being the objective of the present work was to study the efficiency and diversity of nitrogen fixing bacteria that colonize the leguminous species *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. and *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. For this purpose, roots of their plant species were collected in areas of natural occurrence of the species in the rural and peri-urban areas of the municipality of Alta Floresta-MT. The roots that had nodulation were washed and their nodules removed, disinfested and inoculated in culture medium into Petri dishes. These were incubated in the germination chamber (BOD) in the dark at 28 °C for 10 days, after which time the colonies were purified by the streak-out method. The morphological plaque characterization was performed after isolating the strains and the data were converted into a binary matrix of presence and absence of the characteristics, being later used to construct a dendrogram of similarity. After this step the authentication experiment of the isolates was carried out in the two plant species, the isolates that had a high dry mass of the shoot were selected, together with the data of grouping of isolates, to be sequenced, all the isolates selected in the authentication were submitted to the N-fixing efficiency test. Sequencing, allowed to identify the following bacteria that colonize roots of the species M. lathyroides: *Mucilaginibacter gossypicola*, *Novosphingobium arabidopsis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus xiamenensis*, *Bradyrhizobium namibiense* and *Flavobacterium anhuiense*. The isolates M004, M005 and M022 presented values of nitrogen content in the plant very close to the COM N treatment, being indicated for new studies. Sequencing of the 16S rDNA gene allowed to identify the following bacteria that colonize *A. vaginalis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus*, and *Paenibacillus catalpae*. Strains A018, A027 and A051

present potential for further studies, only strain A051 showed high N content in the plant.

Keywords: Diazotrophic bacteria, rice paddy bean, peanut, rizóbios, nodulation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os elementos minerais essenciais para o desenvolvimento das plantas, o nitrogênio (N) é o mais abundante na atmosfera terrestre. Responsável por diversas reações, além de fazer parte da estrutura da clorofila, enzimas e de proteínas. O seu balanço afeta diretamente a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de fotoassimilados, bem como a taxa de crescimento de folhas e raízes. Afetando diretamente o crescimento e a produtividade das plantas (RYLE et al. 1979; TAIZ & ZIEGER, 2016).

Os elevados custos financeiros e energéticos despendidos para a obtenção de fertilizantes sintéticos e a lixiviação dos mesmos, que podem ser potenciais poluidores de lençóis freáticos, tem motivado a busca por formas alternativas de suprimento de nutrientes às plantas, com reduzido impacto ambiental (LIMA, 2009).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é definida como sendo a redução de N_2 em NH_3 , devido à ação da enzima nitrogenase produzida por um grupo de organismos procariontes denominados diazotróficos. Esse importante processo ocorre nos solos através da simbiose ou não de procariotos com diversas plantas, especialmente da família *Fabaceae* (MOREIRA, 2008).

Os rizóbios compreendem um grupo de bactérias do solo que possuem a habilidade de induzir a formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos, até mesmo no caule de plantas leguminosas, convertendo o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta hospedeira (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

O conhecimento e a utilização das potencialidades dos rizóbios que aportam nitrogênio por meio da fixação biológica e que contribuem para o aumento da eficiência da nutrição de nitrogênio, representam uma estratégia economicamente viável para o produtor. Devido a isto, espera-se que os custos de produção possam ser reduzidos pelo aumento do uso e melhoria da eficiência dos processos de FBN (ARAÚJO, 2014).

A inoculação de leguminosas com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio altamente eficientes e adaptadas ao ambiente, substituindo os fertilizantes químicos, é praticada em diversos países. É muito comum que o

produtor, visando o aumento da produção de maneira sustentável e rentável, substitua a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes a base de *Bradyrhizobium* spp. (DALOLIO et al., 2018). O uso de inoculantes com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. permitiu uma economia anual de aproximadamente 3,2 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados. A quantidade de nitrogênio fixada pela cultura da soja através da fixação biológica de nitrogênio foi reportada na ordem de 300 kg N ha⁻¹, fornecendo cerca de 94% das necessidades da safra (CONAB, 2016).

Além da importância da FBN em cultivos extensivos, a agricultura familiar pode ser beneficiada com a utilização dessas tecnologias, garantido uma melhor qualidade e uso do solo, redução de custos de produção auxiliando na fixação da família no campo (RUNJANEK et al., 2012).

Em práticas agrícolas com adubação verde e consórcio de leguminosas em pastagens, são fixadas grandes quantidades de nitrogênio por hectare. Deve-se considerar que nem todo nitrogênio fixado fica à disposição da cultura que vem a seguir, em virtude do tempo de mineralização deste nutriente (MALAVOLTA et al., 2002). Segundo Lima (2009), a adubação verde com espécies leguminosas pode ser uma importante alternativa para incrementar os níveis do nutriente no solo via fixação simbiótica.

Alysicarpus vaginalis (L.) DC. e *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. são espécies leguminosas que possuem incrível potencial de adaptação à diferentes ambientes e, devido ao curto ciclo reprodutivo, podem se tornar plantas potencialmente daninhas em cultivos onde o sistema de manejo favoreça o seu desenvolvimento. Entretanto, estas plantas por serem leguminosas, podem apresentar boa capacidade para fixação biológica de nitrogênio, com potencial de uso em práticas de adubação verde (LORENZI, 2000). Vale ressaltar que o processo de otimização da FBN depende da seleção e especificidade simbiótica na interação rizóbio e a espécie vegetal (LIMA, 2009).

A avaliação da ocorrência, diversidade e eficiência de rizóbios que formam simbiose com diferentes espécies leguminosas tem sido objeto de muitos estudos que buscam conhecer a ecologia desses microrganismos e selecionar estirpes na FBN (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999; CHUEIRE et

al., 2003). Vários métodos são aplicados no estudo da diversidade e taxonomia de rizóbios.

O emprego da engenharia genética como ferramenta no processo de identificação de microrganismos tem sido empregado cada vez mais. Esta ferramenta facilita os processos de identificação. Com a ajuda da engenharia genética, muitas espécies e gêneros novos de rizóbios foram descritos (ROCHA, 2007). O estudo com rizóbios vem crescendo cada vez mais, devido a sua importância ecológica e econômica (MOREIRA, 2008).

A. vaginalis e *M. lathyroides*, apesar de serem leguminosas, não foram estudados profundamente, visando a verificação do potencial de FBN e possível uso em futuras práticas de manejo, buscando atender às necessidades de N das diferentes espécies exploradas economicamente.

Assim sendo, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a diversidade fenotípica e genética e selecionar estirpes de rizóbio envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio em plantas de *A. vaginalis* e *M. lathyroides*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

***Macroptilium lathyroides* L. (Urb.)**

O gênero *Macroptilium*, da família *Fabaceae*, possui aproximadamente 20 espécies nas Américas (SOUSA et al., 2013). *M. lathyroides* é pertencente ao mesmo gênero do sirato (*Macroptilium atropurpureum*), sendo usada como forrageira no Brasil e em diversas regiões da América do Sul (GUERRA et al., 2007; MONKS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2011).

O *Macroptilium lathyroides* (Figura 1), também conhecido como feijão dos arrozais ou feijão rolinha, é uma planta anual, ereta, ocasionalmente ascendente, herbácea, ramificada, de caule glabro e esparsamente seríceo-pubescente. Em condições de sombreamento, a planta pode apresentar crescimento rente ao solo ou até mesmo se entrelaçar, atingindo de 60 a 120

cm de comprimento. Com a maturidade, as hastes tornam-se lenhosas em sua base. As folhas são trifoliadas com largura de 3 a 8 cm e 1 a 3,5 cm de comprimento (LORENZI, 2000).



Figura 1: *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.

Fonte: Bruce Cook (s/d).

As inflorescências são racemos de 15 a 25 cm suportados em pedúnculos de aproximadamente 30 cm de comprimento, com flores vermelhas a vermelho púrpura, podendo ocasionalmente apresentar flores brancas ou rosadas, com diâmetros de 13 a 15 mm. Os frutos são pubescentes, lineares, deiscentes, com 5,5 a 12 cm de comprimento e 2,5 a 3 cm de largura, contendo 20 a 30 sementes castanhas oblongas que caem com facilidade (HEUZÉ et al., 2015).

Nativa da América Tropical, ocorrendo nas Guianas, Brasil e Paraguai, a espécie propaga-se exclusivamente por sementes. É uma planta ruderal medianamente frequente em quase todo o país, infestando principalmente pomares, beiras de estradas, gramados, e terrenos baldios (LORENZI, 2000). Prefere solos úmidos e floresce durante todo o período quente do ano. É hospedeira alternativa do vírus do mosaico (FERREIRA et al., 2001). Pouco exigente em fertilidade, desenvolve-se em locais mal drenados e com pH baixo, também possui capacidade de adaptação em regiões com condições de baixa precipitação (MONKS et al., 2006; FERREIRA, 2002).

Não existem herbicidas registrados para o controle químico de *M. lathyroides*, o que torna difícil a recomendação de produtos químicos para essa finalidade. Além disso, são poucas as pesquisas envolvendo a eficácia de herbicidas para o controle da espécie. Porém, existem relatos de sucesso no controle da espécie infestando lavouras de arroz de sequeiro (SANTOS et al, 2000). Concenço et al. (2012), estudando o controle de *M. lathyroides* com herbicidas aplicados em pós-emergência inicial, relatam que a espécie mostrou-se sensível a uma ampla gama de princípios ativos.

Extratos de partes da planta também apresentam efeito citotóxico e genotóxico, interferindo na divisão celular, causando anormalidades cromossômicas em alface (SILVA et al., 2018a) e forte ação alelopática (SILVA et al., 2018b).

Como característica típica relacionada à sua família botânica (Leguminosa) e facilmente verificada visualmente ao se arrancar as plantas do solo, a presença de nódulos repercute na possibilidade dessa espécie ser usada como possível planta fixadora de nitrogênio, podendo ser explorada na adubação verde, além do seu uso como forrageira para a produção de feno ou silagem ou até como banco de proteínas (ALBUQUERQUE, 2013).

***Alysicarpus vaginalis* (L.) DC.**

Alysicarpus vaginalis (Figura 2), também conhecido como amendozinho, é uma espécie perene, prostrada com a extremidade dos ramos ascendentes, herbácea, glabra, com folhas manchadas, pouco ramificada, com enraizamento nos nós inferiores, de 20-40 cm de altura. É originária da Índia e apresenta propagação principalmente por sementes. Infestam lavouras anuais e perenes, pomares, beira de estradas e terrenos baldios. Prefere solos férteis e bem supridos de umidade, vegeta mais intensamente no verão e tolera certo grau de sombreamento (LORENZI, 2000).

Existem relatos da utilização dessa planta para compor pastagens, produzir feno e forragem e/ou como estratégia para controle de erosão. No Brasil, é considerada planta infestante e sua ocorrência vem aumentando em áreas urbanas e rurais do estado de São Paulo (NATIONAL PLANT DATA CENTER, 2000).



Figura 2: *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC

Foto: Rubens Teixeira de Queiroz, UFPB (2014).

Suas folhas são oblongo-elípticas, podendo apresentar-se na forma lanceolada, de 1,0 – 6,5 cm de longitude por 0,3 – 2,6 cm de largura. A inflorescência é oposta e as folhas atingem até 10 cm de comprimento, com coloração alaranjada, rosada ou avermelhado roxo com 6 mm de comprimento (DUKE, 1981). As vagens apresentam comprimento de 1,2 – 2,5 cm, com veias reticuladas, que se partem em 4 – 7 segmentos, com margens ligeiramente elevadas entre os segmentos, cada segmento com 2,5 – 3 mm de comprimento. Suas sementes são amareladas, salpicadas com marrom ou inteiramente amarelo-marrom a marrom (WAGNER et al., 2014).

A espécie é utilizada como planta medicinal, suas raízes são utilizadas no tratamento contra tosses e febres, as sementes podem ser utilizadas no tratamento de cólicas e desinteria e a planta como um todo pode ser utilizada para tratar ferimentos (FERN, 2014).

A *A. vaginalis* apresenta um grande potencial de utilização na alimentação de equinos e ovinos, a palatabilidade e aceitação da leguminosa é similar ao da alfafa. Desenvolve-se bem em solos moderadamente ácidos, mas não tolera salinidade, suporta solos úmidos, mas não em condições de alagamento, podendo tolerar um curto tempo de inundação. Há também relatos de susceptibilidade ao ataque de nematóides (COOK et al., 2005).

As leguminosas são espécies que podem associar-se com rizóbios nativos ou com estirpes introduzidas por meio de inoculação direta em sementes (BALA et al., 2003). O fato dessas plantas apresentarem nodulação é um indicativo de que essas espécies podem apresentar potencial para fixação biológica de nitrogênio (ALBURQUERQUE, 2013), este é o caso da *Alysicarpus vaginalis* apresenta nodulação abundante, podendo ser verificada visualmente.

Fixação biológica de nitrogênio

A microbiota do solo tem ligação direta com a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres, uma vez que esses sistemas dependem dos processos funcionais por eles realizados, influenciando diretamente nas demais propriedades dos solos (CHÁVES et al., 2011).

O nitrogênio em forma de N_2 constitui 78% dos gases atmosféricos e se difunde nos espaços porosos do solo. Devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 , nenhum animal ou planta conseguem assimilá-lo (HER et al., 1989; WALLEY & STEPHENS, 2002). As bactérias capazes de fixar biologicamente o N_2 possuem uma enzima denominada nitrogenase, que rompe a tripla ligação do N_2 atmosférico e promove sua redução até amônia (VARGAS et al., 1994; HUNGRIA et al., 2001; TORTORA et al., 2012).

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por diversos grupos filogenéticos bacterianos, denominados diazotróficos. Essas bactérias podem viver livres nos mais diferentes ecossistemas, estabelecer simbiose ou estar associadas às plantas e serem denominadas de associativas (MOREIRA et al., 2010a).

As bactérias diazotróficas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como a produção de fitormônios, solubilização de fosfato, antagonismo a fitopatógenos, entre outros. Dentre as bactérias diazotróficas associativas podem-se citar as dos gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus* e *Paenibacillus* (MOREIRA et al., 2010b).

O grupo dos rizóbios se associa simbioticamente às plantas e formam estruturas especializadas nas raízes, conhecidos como nódulos, nos quais ocorre o processo de fixação biológica. Nos nódulos, a amônia sintetizada é rapidamente incorporada aos íons de hidrogênio, ocorrendo a transformação em íons de amônio que serão, então, distribuídas para a planta hospedeira e incorporadas em diversas formas de N orgânico (HUNGRIA et al., 2001). A simbiose ocorre quando os produtos da fotossíntese são liberados pela planta e absorvidos pelas bactérias que fixam o nitrogênio e transferem o NH_4^+ para a planta (VINHAL-FREITAS & RODRIGUES, 2010).

Rizóbio

Este grupo é composto por bactérias gram-negativas, aeróbicas e não esporulantes, distribuídas nos filos *Alpha-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Flacobacteria* e *Sphingobacteria*. Os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* reúnem mais de 85% das espécies de bactérias que nodulam leguminosas (Figura 3) (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001; LEITE, 2015; PEIX et al., 2015).



Figura 3: Raiz de *Macroptilium lathyroides* com nódulos.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

Uma alta diversidade genética entre isolados provenientes de feijoeiro foi relatada por Shamseldin et al. (2005), todos pertencentes ao gênero *Rhizobium*, com eficiência simbiótica variável. Kozusny-Andreani & Andreani-Junior (2014) observaram que *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizobium tropici* agem como promotores de crescimento para alface. Hoffman et al. (2007) selecionaram estirpes de *Bradyrhizobium* eficientes em *Arachis hypogaea* (amendoim). Campelô & Döbereiner (1969) relataram estirpes de rizóbios eficientes para nodulação em Sabiá (*Minosa caesalpiniaefolia* Benth) e Angico (*Piptadenia peregrina* Benth), ambas da mesma subfamília. Santos et al. (2007) isolaram estirpes eficientes com alto potencial para fixação de N₂ em *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* (Estilosantes) e *Aeschynomene americana* (Angiquinho).

A amplificação de regiões específicas do genoma e posterior sequenciamento de bases é uma importante ferramenta para identificação de bactérias. Através do banco de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI) é possível comparar as sequências obtidas em campo com as disponíveis na base de dados, realizando a identificação por comparação (NLM, 2018).

As moléculas de RNA 16S e 23S presentes no ribossomo são empregadas na taxonomia das bactérias por serem regiões extremamente conservadas, e se enquadram como marcadores filogenéticos, conforme relatado por Piazza (2006) e Relman (1999). De acordo com Janda & Abbott (2007), o sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido utilizado para o estudo da taxonomia bacteriana e filogenia. O gene 16S rRNA fornece identificação de gênero e espécie, existem vários trabalhos que indicam que as estirpes que compartilham menos de 97% de similaridade não são da mesma espécie e que estirpes que compartilham menos de 95% de similaridade não são do mesmo gênero (PATEL, 2001; FONTANA et al., 2005; MIGNARD & FLANDROIS, 2006; TINDALL et al., 2010).

A inoculação com rizóbio pode substituir a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, como é o caso da soja no Brasil, inoculada com *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 2010a). O uso de inoculantes no tratamento das sementes de soja a partir da década de 1960, garantiu a competitividade

internacional desta cultura, refletindo diretamente na balança comercial do Brasil (EMBRAPA, 2016).

Leguminosas em sistemas agrícolas

Diversos produtores rurais fazem uso de técnicas que proporcionam a manutenção ou a melhoria do potencial produtivo dos sistemas agrícolas. Dentre as técnicas podemos citar a utilização de leguminosas como adubos verdes e no consórcio com plantas forrageiras.

Calegari et al. (1993) definem adubação verde como sendo uma prática conservacionista pela qual certas espécies de plantas são cultivadas e posteriormente incorporadas, ou ainda mantidas na superfície do solo, durante seu período vegetativo, tendo a finalidade de aumentar a capacidade produtiva do solo. Porém, muitas das espécies utilizadas como adubos verdes, não são adaptadas ou suficientemente estudadas para as diferentes regiões brasileiras (AMABILE & CARVALHO, 2006).

Assim, a adubação verde consiste numa prática capaz de melhorar a fertilidade do solo, tendo como benefícios de adição de matéria orgânica ao solo, com efeitos significativos a médio e longo prazo (ESPÍNDOLA, 1997). Segundo o mesmo autor, é uma técnica que proporciona proteção ao solo e melhora as características físicas e biológicas do solo. Espindola et al. (2005) destacam como vantagens da adubação verde, a absorção de nutrientes das camadas profundas do solo e subsolo com a incorporação à superfície, evita a erosão e poupa o transporte de adubo, pois é produzido no lugar onde será empregado.

Por apresentarem capacidade de fixação de nitrogênio mediante associação simbiótica com rizóbios, as leguminosas são muito utilizadas como adubos verdes e sua importância devido à liberação gradativa de nitrogênio para as culturas posteriores ou associadas (CALEGARI et al., 1993). Estas possuem absorção específica de nutrientes, produzem grande quantidade de fitomassa verde e seca e devido ao seu sistema radicular profundo e bem ramificado, permite maior extração e reciclagem de nutrientes. Desta maneira o uso de adubos verdes, na época adequada aos sistemas de cultivo, é uma alternativa promissora sob os aspectos técnico e econômico (AMABILE &

CARVALHO, 2006). O uso de leguminosas em pastagens contribui para a produção animal, e tem se tornado indispensável para incrementar a produtividade com maior sustentabilidade em sistemas agrícolas e pecuários (BARCELLOS et al., 2008).

A utilização de leguminosas é uma prática muito recomendada nos processos de recuperação de áreas degradadas, devido à cobertura que a vegetação proporciona, protegendo o solo contra a erosão. Ainda, essas plantas são capazes de fornecer a matéria orgânica que através de sua incorporação, estimula diversos processos biológicos e químicos melhorando a fertilidade do solo, além de fornecer nitrogênio através do processo de FBN (BERTONI & LOMBARDI NETO, 2008).

As leguminosas, quando cultivadas em consórcio com pastagens, podem contribuir para o enriquecimento da forragem produzida. O *M. lathyroides* e a *A. vaginalis* são exemplos de espécies que podem ser utilizadas para esta finalidade, pois possui quantidades significativas de proteína bruta, fornecendo alimento com elevado valor nutricional para os animais (BARCELLOS et al., 2008). Entretanto, a utilização de leguminosas para formação de pastagens deve ser orientada de acordo com a espécie que mais se adapte às condições ambientais, para que se possa produzir uma quantidade de massa verde com elevada qualidade nutricional (FREITAS et al., 2011).

A leguminosa *M. lathyroides* tem a capacidade de persistir por um ou dois anos sob pastejo contínuo, ao se realizar o pastejo rotacionado, recomenda-se efetuar o descanso do piquete por 6 a 8 semanas, afim de aumentar a persistência da forragem no sistema (TROPICAL FORAGES, 2017). A espécie desenvolve-se bem com gramíneas abertas, em condições de boa fertilidade e áreas úmidas. A regeneração de plântulas em pastagens só ocorre em condições favoráveis, daí a importância de um manejo adequado. (COOK, 2005).

Tanto o *M. lathyroides* quanto a *A. vaginalis* são leguminosas com expressiva nodulação, perceptível visualmente. Várias espécies dessa família apresentam grande importância ecológica, sendo capazes de promover a FBN fornecendo nitrogênio, o uso dessas leguminosas ocorre em diversos sistemas agroflorestais, agrícolas, pecuária e em programas de recuperação de áreas

degradadas (FARIA et al., 1999). Desta maneira o estudo aprofundado dos organismos que realizam simbiose com estas espécies leguminosas é de suma importância, pois assim podemos obter informações do potencial de fixação de nitrogênio dessas espécies e verificar se são adequadas para o manejo de áreas de pastejo e de produção agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G. P. **Avaliação de acessos de Desmanthus e Macroptilium no Semiárido Pernambucano**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada. 2013.
- AMABILE, R. F.; CARVALHO, A. M. **Cerrado: Adubação Verde**. Embrapa Cerrados. Planaltina – DF. 2006. 369p.
- ARAÚJO, E. O. **Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho**. 2014. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia Área de Concentração em Produção Vegetal). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul. 2014.
- BALA, A.; MURPHY, P.J.; OSUNDE, A.O.; GILLER, K.E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v.22, p.211-223, 2003.
- BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; JUNIOR, G. B. M. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. esp., p. 51-67, 2008.
- BERTONI, J; LOMBARDI NETO, F. **Conservação do Solo**, 7. ed. Editora Ícone: São Paulo. 2008, 355p.
- CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A.; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B.; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T. J. C. **Adubação verde no Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Assessoria de Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 1993. 346p.
- CAMPÊLO, A. B.; DÖBEREINER, J. Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, n.1, p.67-72. 1969.
- CHÁVEZ, L.F.; ESCOBAR, L.F.; ANGHINONI, I. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1254-1261, 2011.
- CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para a cultura da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.27, n.5, p.833-840, 2003.

CONAB - COMPANHIA BRASILEIRA DE ABASTECIMENTO.
Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, v. 3 – Safra 2015/16, n. 7 –
Sétimo Levantamento, Brasília, p.1-158, 2016.

CONCENÇO, G.; CORREIA, I. V. T.; GALON, L. Controle de *Macrotipium lathyroides* com herbicidas aplicados em pós-emergência inicial. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2012, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBCPD, p.18-22. 3129-3133.

COOK, B.G.; PENGELLY, B.C.; BROWN, S.D.; DONNELLY, J.L.; EAGLES, D.A.; FRANCO, M.A.; HANSON, J.; MULLEN B.F.; PARTRIDGE, I.J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. **Tropical Forages: an interactive selection tool**. Brisbane, Austrália. 2005. Disponível em :<
<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/33575>> Acessado em: 18 dez. 2018.

DALOLIO, R. S.; BORIN, E.; CRUZ, R. M. S.; ALBERTON, O. Co-inoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 7, n.2, p.1-7, 2018.

DUKE, J. A. **Handbook of legumes of world economic importance**. Plenum Press:New York. 345 p. 1981.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Página temática: Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília. 2016. Disponível em:<
<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio>> Acessado em: 29 set 2017.

ESPÍNDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. de. **Adubação verde: Estratégia para uma agricultura sustentável**. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, 1997. 20p. Disponível em:<
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/624248/1/doc042.pdf>>
Acessado em: 02 jul. 2017.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; DE-POLLI, H.; ALMEIDA, D. L.; ABOUD, A. C. S. **Adubação verde com leguminosas**. Embrapa Agrobiologia. Brasília, DF. 2005. 9-15p.

EVERITT, B. S. **Cluster analysis**. New York: John Wiley, 1993. 170p.

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

FERN, K. **Tropical Plants Database**. 2014. Disponível em:<
tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Alysicarpus+vaginalis>
Acessado em: 30 dez. 2018.

FERREIRA, O. G. L.; MONKS, P. L.; AFFONSO, A. B. Regeneração natural do feijão dos arrozais *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais....** Piracicaba: SBZ, p.138-139. 2001.

FERREIRA, O. G. L. **Efeito do corte no estágio vegetativo e de épocas de colheita sobre o rendimento e qualidade de sementes de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.** 2002. 56 f. Dissertação (mestrado em Zootecnia). Escola de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FONTANA, C.; FAVARO, M.; PELLICIONI, M.; PISTOIA, E.S.; FAVALLI, C. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.615-619. 2005.

FREITAS, A.D.S.; SILVA, T.O.; MENEZES, S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.R.; FRAGA, V.S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.9, p.1856-1861. 2011.

GUERRA, J. G. M.; ESPINDOLA, J. A. A.; PERIN, A.; TEIXEIRA, M. G.; ALMEIDA, D. L.; ASSIS, R. L. **Desempenho de leguminosas tropicais perenes como plantas de cobertura do solo.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 20).

HEUZÉ, V.; TRAN, G.; GIGER-REVERDIN, S.; BASTIANELLI, D.; LEBAS, F. **Pasey bean (*Macroptilium lathuroides*).** Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. 2015. Disponível em: <<https://www.feedipedia.org/note/627>> acessado em: 09 nov. 2018.

HER, G.R.; GLAZEBROOK, J.; WALKER, G.C.; REINHOLD, V.N. Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium melioli* Strain Rm1021. **Carbohydrate Research**, v.198, p.305-312, 1989.

HOFFMAN, L. V.; SOUSA, J. M. de. S.; JACOME, R. G.; SUASSUNA, T. de. M. F. Seleção de isolados de rizóbio para nodulação de amendoim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 11, n. 2, p. 107-111, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja. 2001. 48 pg. circular técnica n.35 Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/memoriaticna/circotec/circTec35.pdf>> Acessado em: 02 jul. 2017.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.9, p.2761-2764. 2007.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R. Colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface. **Nucleus**, v. 11, n. 2, p. 433-452. 2014.

- LEITE, J. **Simbiose feijão caupi e rizóbio: Diversidade de bactérias associadas aos nódulos**. 2015. 75f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015.
- LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro. 2009.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum: Nova Odessa. 608p. 2000.
- MALAVOLTA, E.; PIMENTEL-GOMES, F.; ALCARTE, J. C. **Adubos e adubações**. Nobel: São Paulo. 200p. 2002.
- MIGNARD, S.; FLADROIS, J.P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal of Microbiology Methods**, v.67, n.3, p.574-581, 2006.
- MONKS, P. L.; FERREIRA, O. G. L.; PÓLO, E. A.; SILVA, J. B. Produção e qualidade de sementes de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. sob diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n.2, p 107-112, 2006.
- MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S; HUISING, E. J.; GIGNELL, D. E. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 768p. 2008.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99. 2010a.
- MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E.J.; GIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA. 367p. 2010b.
- NACIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **National Center for Biotechnology Information**. 2018. Disponível em: < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> > acessado em: 20 jan. 2019.
- NATIONAL PLANT DATA CENTER, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA, USA. 2000. Disponível em:<http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26456> Acessado em: 18 dez. 2018.
- PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnosis**, v.6, p.313-321. 2001.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.34, n.1-3, p.17-42, 2015.

PIAZA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RELMAND, D. A. The search for unrecognized pathogen. **Science**, v.284, p.1308-1310, 1999.

RUNJANEK, N.; XAVIER, G.; ZILLI, J.; AMÂNCIO, C.; STRALIOTTO, R.; ALVES, B.; URQUIAGA, S. Potencial de expansão da FBN para a produção de grãos no Brasil pela agricultura familiar. In: XVI Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola, 2012, Londrina. **Anais...** Relare, v.16, p.45-46.

SANTOS, F. J.; PITOMBEIRA, J. B.; PINHO, J. L. N.; MELO, F. I. O. Controle químico de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado no estado do Ceará. **Planta Daninha**, v.18, n.1, p. 29-37. 2000.

SANTOS, E. R. S.; STAMFORD, N. P.; BORGES, W. L.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; NASCIMENTO, L. R.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; BEZERRA, R. V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.20-27. 2007.

SHAMSELDIN, A. A. Y.; VINUESA, P.; THIERFELDER, H.; WERNER, D. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian soils and display cultivar-dependent symbiotic efficiency. **Symbiosis**, v.38, n.1, p.145-161, 2005.

SILVA, M. S. A.; YAMASHITA, O. M.; ROSSI, A. A. B.; CONCENÇO, G.; CARVALHO, M. A. C.; FELITO, R. A. Cytotoxic and genotoxic effects of *Macroptilium lathyroides*. **Planta Daninha**, v.36, p.1-8. 2018a.

SILVA, M. S. A.; YAMASHITA, O. M.; ROSSI, A.A.B.; KARSBURG, I.V.; CONCENÇO, G.; FELITO, R. A. Potencial alelopático do extrato aquoso das folhas e raízes frescas de *Macroptilium lathyroides* na germinação e no desenvolvimento inicial de alface. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.16, n.1, p.89-95, 2018b.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. 312p. 2007.

SOUSA, L. M. G.; GOIS, R. W. S.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADENETO, M.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G. Constituintes químicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (Fabaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1370- 1374, 2013.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. C. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbios**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 58p. 1999.

ROCHA, G. P. **Bactérias Associativas e Simbiontes dos Nódulos de *Arachis pinto* (Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). 2007. 112f. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA. 2007.

RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E.; GORDON, A.J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

VASCONCELOS, W. A.; SANTOS, E. M.; ANDRADE, A. P.; BRUNO, R. L. A.; EDVAN, R. L. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de figo de pombo (*Macroptilium lathyroides*). **Revista Trópica**, v.5, n.1, p.3-11, 2011.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artemed. p.719. 2016.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.249-266, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 10 ed. Artmed: Porto Alegre. 167-170p. 2012.

TROPICAL FORAGES. **Macroptilium lathyroides**. 2017. Disponível em: <http://tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/macroptilium_lathyroides.htm>. Acesso em: 11 nov. 2018.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; PERES, J. R. R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos do cerrado**. Embrapa Cerrados. Brasília. 15-20 p. 1994.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, v.3, n.2, p.143-154, 2010.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; LORANCE, D. H. **Flora of the Hawaiian Island**. Smithsonian Institution. Washington DC, EUA. 2014. Disponível em: <<http://botany.si.edu/pacificislandbiodiversity/hawaiianflora/index.htm>> Acessado em: 30 dez. 2018.

WALLEY, F.L.; STEPHENS J.H. Rhizobia in: DEKKER, M. **Encyclopedia of Pest**, 1. ed, CRC Press, p. 718-726. 2002.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, v. 21. n. 6, p. 569-576. 2001.

3. CAPÍTULOS

3.1. EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO QUE COLONIZAM *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.

Resumo – O *Macropitilium lathyroides* é utilizado com forrageira no Brasil, como característica típica relacionada a sua família, verifica-se visualmente a presença de nódulos repercutindo na possibilidade de sua utilização como planta fixadora de nitrogênio podendo ser utilizada na adubação verde. Assim sendo o objetivo do presente trabalho foi estudar a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam a espécie leguminosa *Macropitilium lathyroides* (L.) Urb. Para tanto foram coletadas raízes de *M. lathyroides* em áreas de ocorrência natural das espécies na zona rural e periurbana do município de Alta Floresta-MT. As raízes que apresentaram nodulação foram lavadas e seus nódulos retirados, desinfestados e inoculados em meio de cultura 79 dentro de placas de Petri. Estas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) no escuro por 28 °C por 10 dias, após esse período as colônias foram purificadas pelo método de esgotamento por estrias. A caracterização morfológica em placa foi realizada após o isolamento das estirpes e os dados foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência das características, sendo posteriormente utilizados para construção de um dendrograma de similaridade. Foi possível observar a existência de 3 grupos distintos de bactérias com similaridade de 15%. O experimento de autenticação foi conduzido em casa de vegetação e permitiu constatar que dos 39 isolados, 19 deles apresentaram potencial para serem conduzidos para o teste de eficiência de fixação de nitrogênio. O sequenciamento do gene 16S rDNA, permitiu identificar as seguintes bactérias que colonizam raízes da espécie vegetal: *Mucilaginibacter gossypiicola*, *Novosphingobium arabidopsis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus xiamenensis*, *Bradyrhizobium namibiense* e *Flavobacterium anhuiense*. As plantas inoculadas com os isolados M004, M005 e M022 apresentaram teor de nitrogênio na parte aérea muito próxima ao do tratamento com nitrogênio, indicado o potencial destas estirpes em realizar a fixação biológica de nitrogênio em simbose com *Macropitilium lathyroides*.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, feijão dos arrozais, rizóbio, nodulação.

Abstract - *Macroptilium lathyroides* is used with forage in Brazil, as a typical characteristic related to its family, it is visually verified the presence of nodules repercussion in the possibility of its use as nitrogen fixed plant and can be used in green fertilization. This being the objective of the present work was to study the efficiency and diversity of nitrogen fixing bacteria that colonize the leguminous species *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. For this purpose, *M. lathyroides* roots were collected in areas of natural occurrence of the species in the rural and peri - urban areas of the municipality of Alta Floresta-MT. The roots that had nodulation were washed and their nodules removed, disinfested and inoculated in culture medium into Petri dishes. These were incubated in the germination chamber (BOD) in the dark at 28°C for 10 days, after which time the colonies were purified by the streak-out method. The morphological plaque characterization was performed after isolating the strains and the data were converted into a binary matrix of presence and absence of the characteristics, being later used to construct a dendrogram of similarity. It was possible to observe the existence of 3 distinct groups of bacteria with similarity of 15%. The authentication experiment was carried out in a greenhouse and allowed to verify that of the 39 isolates, 19 of them had potential to be conducted for the test of nitrogen fixation efficiency. Sequencing of the 16S rDNA gene allowed to identify the following bacteria that colonize plant roots: *Mucilaginibacter gossypiiicola*, *Novosphingobium arabidopsis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus xiamenensis*, *Bradyrhizobium namibiense* and *Flavobacterium anhuiense*. The plants inoculated with the isolates M004, M005 and M022 showed nitrogen content in the aerial part very close to the with nitrogen treatment, indicating the potential of these strains in performing the biological nitrogen fixation in symbiosis with *Macroptilium lathyroides*.

Key words: Diazotrophic bacteria, rice bean, isolated, nodulation.

INTRODUÇÃO

O gênero *Macroptilium*, da família Fabaceae, possui aproximadamente 20 espécies nas Américas (SOUSA et al., 2013). *M. lathyroides* é pertencente à mesma família do sirato (*Macroptilium atropurpureum*), sendo usada como forrageira no Brasil em diversas regiões da América do Sul (MONKS et al., 2006; GUERRA et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2011). O sirato é considerado uma planta promíscua, pois tem a capacidade de nodular com bactérias de diversos gêneros. A estirpe SEMIA 656 (*Bradyrhizobium* sp.) é recomendada para a cultura pela Reunião de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE) e autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes (LIMA, 2007).

Como característica típica relacionada ao seu gênero (Leguminosa) e facilmente verificada visualmente, ao se arrancar as plantas do solo, a presença de nódulos, repercutem na possibilidade dessa espécie ser usada como possível planta fixadora de nitrogênio, além de seu uso atual como forrageira, pois são cultivadas para a produção de feno ou silagem ou até como banco de proteínas (ALBUQUERQUE, 2013).

Entretanto, a espécie tem se tornado uma espécie potencialmente daninha em áreas com cultivo de milho e soja e em áreas renovação e de pastagens (CONCENÇO et al., 2012). Assim, está merecendo atenção em pesquisa para obtenção de informações de sua biologia (SILVA et al., 2018b) e práticas que permitam seu uso controlado, visto que aparentemente pode fixar nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por diversos grupos filogenéticos bacterianos, denominados diazotróficos. Essas bactérias podem viver livres nos mais diferentes ecossistemas, estabelecer simbiose ou estar associadas às plantas e serem denominadas de associativas (MOREIRA et al., 2010a).

A inoculação com rizóbio pode substituir a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, como é o caso da soja inoculada com *Bradyrhizobium*

(MOREIRA et al., 2010b). O uso de inoculantes, a partir da década de 1960, garantiu a competitividade internacional para a cultura da soja, refletindo diretamente na balança comercial do Brasil (EMBRAPA, 2016).

Por apresentarem capacidade de fixação de nitrogênio mediante associação simbiótica com rizóbios, as leguminosas são muito utilizadas como adubos verdes e sua importância vêm crescendo devido à liberação gradativa de nitrogênio para as culturas posteriores ou associadas. Estas possuem absorção específica de nutrientes, produzem grande quantidade de fitomassa verde e seca e, devido ao seu sistema radicular profundo e bem ramificado, permite maior extração e reciclagem de nutrientes (LANGE et al., 2009; TEODORO et al., 2009).

Desta maneira o uso de espécies com essa capacidade simbiótica, mesmo vistas como plantas daninhas, tal como a *M. Lathyroides* tem potencial de uso como adubos verdes. Cultivados da maneira e época adequadas aos sistemas de cultivo, seriam uma alternativa promissora sob os aspectos técnico e econômico (AMABILE E CARVALHO, 2006).

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi estudar a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam a espécie leguminosa *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de nódulos de *Macroptilium lathyroides*

As raízes de *M. lathyroides* foram coletadas em áreas de ocorrência natural da espécie na zona rural e periurbana do município de Alta Floresta - MT, situado no extremo norte do Estado de Mato Grosso, sudeste da Floresta Amazônica, latitude 9° 52' 32" S, longitude 56° 05' 10" W e altitude 288 metros (INMET, 2016).

O clima do município de Alta Floresta é classificado como do tipo Am (tropical úmido ou subúmido), com temperatura média superior à 24 °C e precipitação de 2.800 a 3.100 mm (ALVARES et al., 2013).

O procedimento de coleta de raízes foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Hungria (1994). Foram coletadas amostras aleatórias de 20 plantas. As raízes foram retiradas do solo de maneira a manter o mais intacto possível o sistema radicular, removendo o excesso de solo e retirando a parte aérea, com auxílio de uma pá de jardim e uma tesoura de poda.

As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas em caixa de isopor e imediatamente levadas para o Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta-MT.

Isolamento de estirpes bacterianas

As raízes coletadas foram lavadas e, as que apresentavam nodulação, foram envolvidas em papel toalha para retirada do excesso de água e, com auxílio de uma tesoura de poda foram fragmentadas em partículas menores a fim de facilitar a retirada do inóculo do interior do nódulo. Foram retirados cinco nódulos por sistema radicular.

Para desinfecção e purificação dos nódulos, foi adotada a metodologia proposta por Hungria (1994). Cada nódulo foi submerso em álcool 95% por dez segundos, na sequência em solução de hipoclorito a 2,5% por 3 minutos e, posteriormente foi realizada a lavagem em água destilada e

esterilizada por oito vezes. Os nódulos foram macerados e posteriormente inoculados em meio de cultura YMA em placas de Petri (VICENT, 1970).

O meio de cultura YMA foi composto de, 10g de manitol, 0,1 g de solução de fosfato de potássio dibásico, 0,4 g de solução de fosfato de potássio monobásico, 0,2 g de solução de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,1 g de solução de cloreto de sódio, 0,4 g extrato de levedura, 5 mL de solução de azul de bromotimol (0,5% de azul de bromothimol dissolvidos em 0,2 mol L⁻¹ de KOH) e 15 g de ágar por litro para meio sólido (DÖBEREINER et al., 1999; FRED & WAKSMAN, 1928).

As placas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) no escuro a 28 °C por 10 dias. As culturas foram purificadas pelo método de esgotamento por estrias conforme descrito por Tortora (2012). Uma alça de platina flambada foi utilizada para retirar as culturas mistas das placas de Petri onde o isolado do nódulo foi incubado, as colônias foram semeadas em estrias na superfície do meio de cultura 79 em placas de Petri. Ao longo da estria, as bactérias são depositadas a medida que a alça entra em contato com o meio de cultura. As últimas células depositadas na alça de platina foram afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas, permitindo repica-las e obter uma cultura pura contendo somente um tipo morfológico de bactéria, foram isoladas 39 estirpes bacterianas.

Caracterização fenotípica

Características culturais

A caracterização morfológica em placa (Figura 1) foi realizada após o isolamento das estirpes nas condições de temperatura de crescimento e meio de cultura descrito anteriormente. A seguir são detalhadas as características morfológicas, segundo descrição de MELLONI et al. (2006) e DIONÍSIO et al., (2016):



Figura 1: Placa utilizada na caracterização de estirpes de nódulos de raízes de *Macrotium lathyroides*, placa com isolado com 10 dias de crescimento.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

- a) Tempo de crescimento: Após a repicagem dos isolados em placas de Petri contendo meio 79, foi considerado crescimento rápido aquelas colônias que puderem ser visualizadas com 2 a 3 dias de incubação; intermediário, com 4 a 5 dias de incubação; lento, com 6 a 10 dias de incubação e, muito lento, as colônias que pudessem ser visualizadas com mais de 10 dias de incubação. Após sete dias de incubação foram determinadas as demais características;
- b) Diâmetro das colônias: as bactérias foram agrupadas naquelas cujo diâmetro era inferior a 1,0 mm ou superior a esse valor;
- c) Coloração das colônias: foram caracterizadas quanto as cores: incolor, branca, creme, amarela, rosa, verde ou marrom;
- d) Forma da colônia: na determinação do formato das colônias foram consideradas as formas: puntiforme, circular ou irregular;
- e) Elevação da colônia: foram considerados os formatos: plana, lente, convexa, drop-like, umbanada ou umbilicada.
- f) Característica da borda da colônia: foram determinadas como sendo: Inteira, ondulado, filamentosa, lobada, denteada ou nenhuma.

- g) Transparência da colônia: foram consideradas como opacas ou translúcidas.
- h) Características da superfície da colônia: foram consideradas como rugosa, lisa ou papilosa;
- i) Produção de goma: As bactérias foram classificadas como de produção: escassa, pouco, moderada ou abundante;
- j) Consistência da goma: foi classificada como seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butílica;
- k) Elasticidade da colônia: foram classificadas em elástica ou não elástica;
- l) Alteração do pH do meio: A coloração azul no meio de cultura foi considerada como crescimento alcalino, coloração amarela como sendo ácido e a não alteração da cor original do meio (verde) como neutro, comparando os isolados com placas sem inoculação.

Agrupamento dos isolados por similaridade morfológica

Após a caracterização cultural dos isolados, com os dados obtidos com a morfologia de colônias bacterianas, foi construído um dendrograma de similaridade por distância Euclidiana, as variáveis foram analisadas como multicategóricos binários e análise de componentes principais, realizada a fim de definir as características de maior contribuição para o estudo de diversidade das estirpes, os dados foram utilizados para agrupar as estirpes pela similaridade morfológica, permitindo verificar grupos de indivíduos semelhantes. O dendrograma foi confeccionado pelo método Ward's com auxílio do software Statistica (STATSOFT, INC., 2011).

Autenticação das estirpes

A capacidade de nodulação das estirpes isoladas foi verificada seguindo-se a metodologia proposta por Everitt (1993). O experimento para autenticação foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao LaSeM na Universidade do Estado de Mato Grosso, campus universitário de Alta Floresta.

As sementes de *M. lathyroides* foram submetidas à quebra de dormência por imersão em ácido sulfúrico P.A. por 30 minutos, seguido de lavagem com água destilada estéril (BRASIL, 2009). A desinfestação foi realizada com hipoclorito a 2,5% por 10 minutos seguidos de oito lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada. Foram semeadas 3 sementes da espécie em cada tubete. Após a emergência das plantas, foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma planta por tubete. Esta foi escolhida, buscando-se manter a uniformidade de tamanho entre todas as plantas das demais unidades experimentais.

As plantas foram cultivadas em tubetes de 355 cm³ contendo areia e vermiculita na proporção de 2:1, previamente esterilizados. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva autoclavada conforme Sarruge (1975) em duas condições, uma com nitrogênio e outra com 10x menos nitrogênio conforme a Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Concentração de nutrientes em solução nutritiva utilizada no experimento de autenticação de estirpes bacterianas obtidos de nódulos de *Macrotillium lathyroides*.

| Macronutrientes | Com nitrogênio | | Baixa concentração de N Concentração (mg L ⁻¹) | |
|------------------------|----------------|--------|---|---------|
| | 50% | 25% | 50% | 25% |
| N | 105 | 52,5 | 10,5 | 5,25 |
| P | 15,5 | 7,75 | 15,5 | 7,75 |
| K | 117 | 58,5 | 117 | 58,5 |
| Ca | 100 | 50 | 100 | 50 |
| Mg | 24 | 12 | 24 | 12 |
| S | 34,95 | 17,475 | 32 | 16 |
| Micronutrientes | | | | |
| B | 0,25 | 0,125 | 0,25 | 0,125 |
| Mn | 0,25 | 0,125 | 0,25 | 0,125 |
| Zn | 0,025 | 0,0125 | 0,025 | 0,0125 |
| Cu | 0,01 | 0,005 | 0,01 | 0,005 |
| Mo | 0,005 | 0,0025 | 0,005 | 0,0025 |
| Fe | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 |
| Cl | 0,35 | 0,175 | 291,475 | 145,738 |

Foram utilizados como fontes dos nutrientes os seguintes reagentes: KH₂PO₄, KNO₃, Ca(NO₃)₂ 4H₂O, MgSO₄7H₂O, Fe-EDTA, KCl, CaCl₂ 2H₂O e

Micronutrientes (H_3BO_3 , $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$, H_2MoO_4). Da semeadura até 15 dias de emergência, as plantas foram irrigadas com solução em 25% da concentração de nutrientes e, após esta data, até o momento da coleta do experimento, foi utilizada a solução a 50% da concentração.

Cada planta foi inoculada com 1,0 mL de inóculo (Figura 2). O preparo do inóculo consistiu no crescimento das estirpes bacterianas em meio YMA líquido (mesma composição do meio sólido, porém isento de ágar) sob agitação de 150 rpm, até a fase log de crescimento (HUNGRIA, 1994).

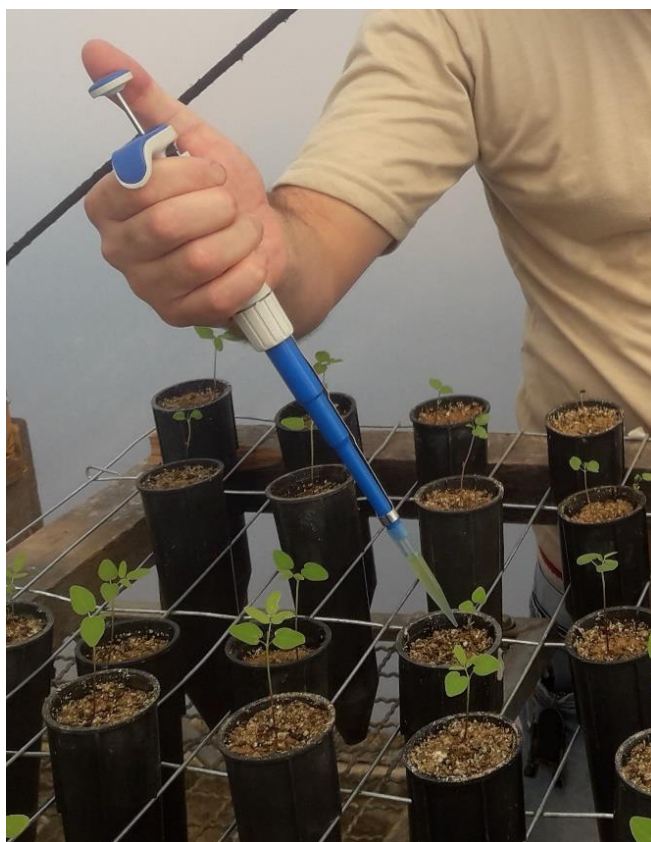


Figura 2: Procedimento de inoculação de estirpes em *Macroptilium lathyroides*.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, constituído de 41 tratamentos, sendo 39 estirpes bacterianas, irrigadas com solução nutritiva contendo 10 X menos nitrogênio que o recomendado, e dois tratamentos sem inoculação (um com nitrogênio em

concentrações adequadas e outro com 10 X menos nitrogênio do que o recomendado).

A coleta das plantas foi realizada 47 dias após a semeadura (início do florescimento), separando-se parte aérea, raiz e nódulos. As diferentes partes da planta foram secadas em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C por 72 horas e, posteriormente pesadas. Foi determinada a eficiência relativa (ER), que corresponde à relação entre rendimento do tratamento inoculado sobre o tratamento com nitrogênio em porcentagem, das estirpes pela equação:

$$ER = \left(\frac{MSPA \text{ tratamento inoculado}}{MSPA \text{ tratamento com N}} \times 100 \right).$$

- ER – Eficiência relativa;
- MSPA tratamento inoculado – massa seca da parte aérea do tratamento inoculado com a estirpe bacteriana;
- MSPA – massa seca da parte aérea do tratamento sem inoculação e com Nitrogênio.

Os dados de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total, foram transformados para Log (x) para ajuste de normalidade dos dados. Massa seca de nódulos (MSN) foi transformado em Log (x+10) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) em Log (x) + 0,5. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2014).

Identificação molecular das estirpes bacterianas

As bactérias selecionadas através do teste de autenticação, ou seja, os isolados M002, M004, M005, M014, M016, M019, M022, M024, M028, M033, M035 e M036, foram submetidos à identificação molecular utilizando-se o sequenciamento parcial da região 16S. A seleção foi de acordo com o valor de MSPA e o grupo a que o isolado pertencia.

Para o sequenciamento molecular, as colônias bacterianas foram transferidas para microtubos 1,5 mL contendo 200µL de água autoclavada, seguindo protocolo de Ferreira (2008). Essa solução foi usada como fonte de DNA para PCR (Polymerase Chain Reaction). Os primers utilizados foram 1378R (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

As reações foram realizadas contendo 1,0 µL da suspensão bacteriana, 10x de buffer, 0,5 µM de cada deoxirribonucleotídeos trifosfato, 0,2µL de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase (SIGMA®) diluídos em água Milli-Q autoclavada para um volume total de 50 µL. Um controle negativo (reação de PCR sem material bacteriano) foi incluído em todas as reações. A PCR foi realizada em termociclador (Figura 3) T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62,5 °C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

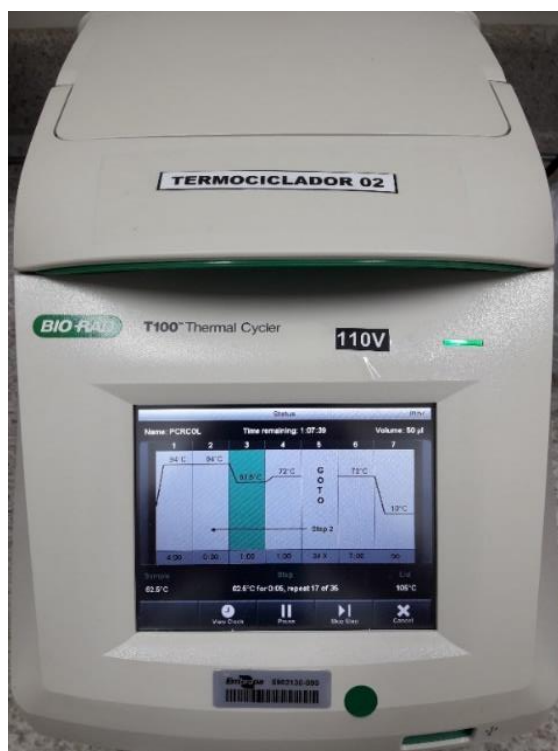


Figura 3: Termociclador T100 ThermalCycler (BIO-RAD) utilizado para reação em cadeia Polimierase.
Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) submetidos à corrida de duração de 1 hora à 60 volts. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta mediante a coloração com GELRED. Considerou-se que o material apresentou amplificação quando houve observação de fragmentos de tamanho esperado (1400 pb).

Os produtos de PCR foram purificados com isopropanol gelado à 100% e centrifugação à 9.000 rpm por 15 minutos, após descarte do sobrenadante, 200 µL de álcool à 70% e centrifugação à 9.000 por 5 minutos, seguida de novo descarte de sobrenadante e evaporação em banho seco à 35 °C. Após a evaporação as amostras foram ressuspensas em 20 µL de água Milli-Q autoclavada e incubadas em geladeira por 24 horas.

Novamente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,0%, com marcador de baixo peso molecular para a quantificação de DNA. Após quantificação da concentração de DNA, as amostras foram diluídas para 50ng/µL e alíquotas de 9,5µL foram enviadas para o Laboratório Myleus Biotecnologia, para sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA, conforme protocolo do laboratório. As sequências obtidas foram comparadas por BLASTn contra base de dados do NCBI. Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 750.

Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio

Para este experimento, foram estudados os isolados que apresentaram resultado positivo para formação de nódulos e maior rendimento de massa seca da parte aérea no experimento de autenticação (M002, M004, M005, M008, M014, M016, M019, M022, M024, M025, M026, M028, M030, M032, M033, M035, M036, M037 e M039).

O experimento foi realizado em vasos de plástico com capacidade de 1,7 litros, com solo coletado na zona rural de Alta Floresta – MT (Figura 4). A adubação foi realizada de acordo com análise química do solo (Tabela 2), seguindo-se a recomendação de Ribeiro et al. (1999) para a cultura da soja.

Tabela 2. Resultado da análise de solo utilizado no experimento de eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Análise realizada no Laboratório de Análises de solo, Adubo e Foliar da Universidade do Estado de Mato Grosso - LASAF.

| Resultado da análise de solo | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------|------|-------------------|--------------------|-----|------|------------------------------------|------|------|-------|-------|--------|------|
| Amos. | Profun. | pH | P | K | K | Ca | Mg | Al | H+Al | Areia | Silte | Argila | |
| . | . cm | Água | CaCl ₂ | mg/dm ³ | | | cmol _c /dm ³ | | | | | | g/kg |
| 1 | 00 - 20 | 5,6 | 5,1 | 9,7 | 222 | 0,57 | 4,71 | 1,13 | 0 | 1,73 | 644 | 99 | 257 |

| Resultados calculados | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---------|------------------------------------|------|--------|--------|------------|----|------|---------|------|------|--|--|
| Amos. | Profun. | CTC | Soma | Satur. | Satur. | Satur. por | | | Relação | | | | |
| . | . cm | pH 7 | de | . por | por | elemento | | | | | | | |
| | | T | Base | base | alumí | K | Ca | Mg | Ca/Mg | Ca/K | Mg/K | | |
| | | cmol _c /dm ³ | S | S | nio | % | % | % | | | | | |
| 1 | 00 - 20 | 8,1 | 6,4 | 78,8 | 0,0 | 7,0 | 58 | 13,9 | 4,2 | 8,3 | 2,0 | | |



Figura 4: Visão geral das unidades experimentais no teste de eficiência na fixação biológica de nitrogênio de estirpes em *Macroptilium lathyroides*.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

Foram semeadas 10 sementes por unidade experimental, após superada a dormência destas e previamente desinfestadas, conforme descrito anteriormente. E após a emergência, foram mantidas as 5 plantas mais uniformes. As plantas foram inoculadas com 1000 µL de caldo bacteriano (bactérias crescidas em meio 79 líquido conforme descrito no experimento de autenticação).

Os tratamentos foram constituídos por 19 isolados, além de um tratamento sem adição e outro com a adição de N, totalizando 21 tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. O experimento foi conduzido por 45 dias (início do florescimento) até a realização da coleta.

Após a coleta, cada planta foi separada em parte aérea, sistema radicular e nódulos e posteriormente acondicionados em sacos de papel e secados em estufa a 65 °C com ventilação forçada durante 72 horas. As avaliações realizadas foram: comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO), número de nódulos (N° de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV) que correlaciona o teor de clorofila e o N na planta, teor de nitrogênio na parte aérea (TEDESCO et al.,1995) e conteúdo de nitrogênio por vaso (teor de N na parte aérea x peso da parte aérea) . A média dos dados foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 4.6 (FERREIRA, 2014). As variáveis VR, N° de nódulos, MSPA, MSN, MST e CONT N foram transformados em $\log(x+2)$, para ajuste de normalidade dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica das colônias

Na caracterização morfológica das estirpes isoladas de nódulos de *M. lathyroides* avaliados (Figura 5), verificou-se que aproximadamente 49% destes apresentaram crescimento rápido (≤ 3 dias), 46% acidificaram o meio de cultura, 15% o mantiveram neutro e 38% alcalinizaram o meio de cultura.

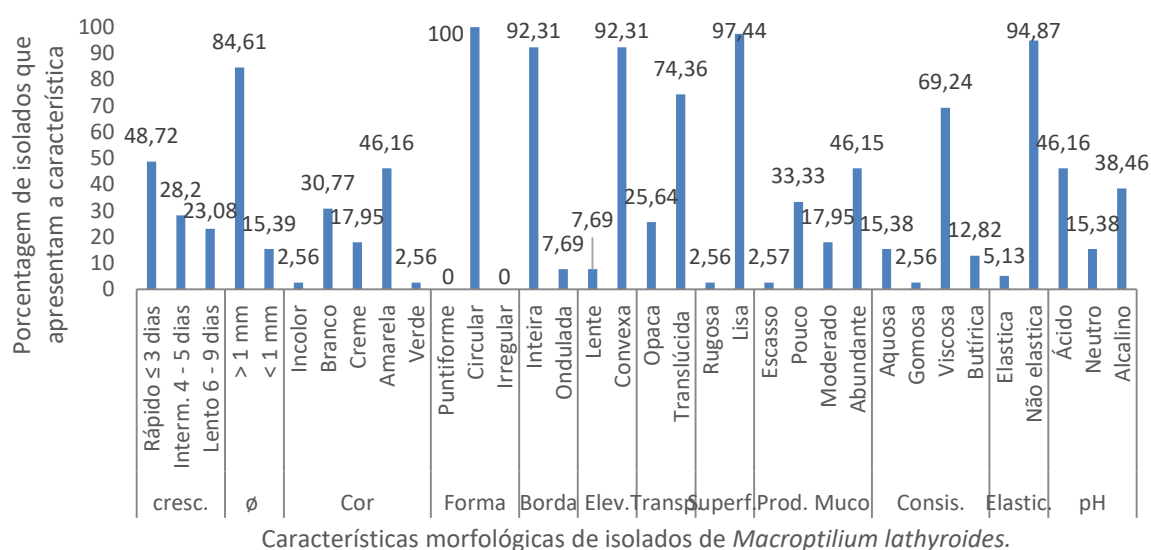


Figura 5. Frequência de isolados por caracterização morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de *Macropitilium lathyroides*.

Em geral, a velocidade de crescimento de bactérias diazotróficas é muito rápida e não excede 3 dias, como verificado neste estudo, resultando em ocupação total da placa de Petri em curto intervalo de tempo (EAGLESHAM et al., 1984; MARTINS et al., 1997b). Comuns em regiões tropicais, como é o caso do ambiente em que foram coletados os materiais desta pesquisa, um grande número de estirpes de crescimento rápido nodulam espécies de leguminosas herbáceas, especialmente as nativas (LAWRIE, 1983; SPRENT, 1994). Nesta ótica, há também especulações sobre a relação entre as características que determinem que o crescimento rápido e o crescimento sob condições de elevadas temperaturas devam estar associadas geneticamente

(MARTINS et al., 1997b). Estas duas condições são as que os microrganismos estudados estão sujeitos em regiões tropicais, como a Amazônia brasileira.

Essas estirpes de rizóbios também têm como característica a alteração do pH do meio de cultura, acidificando-o neste curto intervalo de tempo em que estas crescem e ocupam a placa, conforme verificado nesta pesquisa. As mudanças do pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura se devem ao consumo de açúcares por estas estirpes que, logo após a utilização preferencial desta substâncias, excretam ácidos orgânicos, acidificando o meio (TAN & BROUGHTON, 1981).

Outras pesquisas reportam resultados semelhantes aos verificados neste estudo, em condições de coleta de bactérias em diferentes ambientes. Chagas Junior et al. (2010) também estudando bactérias diazotróficas em feijão caupi na Amazônia, verificaram que a velocidade de crescimento nessa condição foi predominantemente rápida, assemelhando-se aos resultados anteriormente descritos. Saturno & Andrade (2015) relatam isolados de rizóbios obtidos em áreas cultivadas e de florestas no Paraná, que apresentaram crescimento rápido.

Araújo & Gualter (2017) em seu estudo com bactérias nativas de solos do Cerrado oriundo de nódulos de feijão caupi, relataram resultados semelhantes a esta pesquisa. Os autores encontraram uma grande heterogeneidade de bactérias nodulíferas, sendo que 27% destas tinham a capacidade de alcalinizar o meio de cultura. Ehrhardt-Brocardo et al. (2015), com isolados de nódulos de Bracatinga (*Mimosa scabrella*), também observaram isolados com capacidade de alcalinizar o pH do meio. A habilidade dos isolados de alcalinizar o meio, observada no presente estudo, foi relatada por Martins (1996) como sendo uma possível vantagem seletiva para o rizóbio.

Dos isolados de nódulos de *M. lathyroides* analisados (Figura 5), cerca de 85% deles apresentaram colônias superiores a 1 mm de diâmetro. Estes dados assemelham-se aos obtidos por Silva et al. (2014) que, em estudo com diversidade de rizóbios, verificaram que aproximadamente 76% dos isolados tiveram comportamento semelhante para diâmetro de colônia aos obtidos neste estudo.

Quanto à coloração, a maioria dos isolados, cerca de 46%, apresentaram coloração amarela, as demais variaram entre branca, creme,

incolor e verde (Figura 5). A coloração amarela é indicativo da alteração no pH do meio de cultura, indicando que são rizóbios de crescimento rápido e que geralmente acidificam o meio, tornando-o amarelo ou amarelado (TAN & BROUGHTON, 1981), como o verificado neste estudo, respaldando os resultados obtidos na determinação do pH do meio, relatado anteriormente. Já os rizóbios de crescimento lento, tendem a torná-lo verde ou esverdeado após alcalinizarem o meio de cultura (MARTINS et al., 1997a).

As colorações dos isolados obtidos são semelhantes aos relatados por Cassetari (2010) que estudou bactérias diazotróficas da Mata Atlântica, verificando que os seus isolados apresentaram colônias com coloração amarelo intenso ou variando de branco a creme. Também Araújo & Gualter (2017) obtiveram resultados semelhantes em seu estudo com bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de feijão caupi, eles observaram isolados com colorações amarelas e brancas. Em ambos os estudos, as bactérias citadas eram de crescimento rápido e acidificaram o meio de cultura.

No que diz respeito à forma, borda, elevação, transparência, superfície da colônia e elasticidade, 100% apresentaram formato circular, aproximadamente 92% produziram borda inteira, 92% convexa, 74% eram translúcidas, 97% lisas e 95% não apresentaram elasticidade (Figura 5). Chagas Junior et al. (2010) relatam que, dos isolados estudados por eles, todos apresentaram comportamento similar aos isolados de *M. lathyroides*. Também Stocco et al. (2008), avaliando a biodiversidade de rizóbios em feijoeiro, obtiveram dados semelhantes, os autores observaram que dos isolados obtidos 100% apresentaram superfície lisa, elevação de colônia convexa e diâmetro maior que 1 mm.

Dos isolados avaliados neste trabalho, 41% deles, além de apresentarem crescimento rápido, apresentaram muco abundante e acidificaram o meio (M001, M003, M006, M007, M010, M011, M013, M015, M017, M018, M021, M029, M031, M034, M038 e M040).

Moreira & Pereira (2001) relatam que essas características de crescimento rápido e acidificação do meio de cultura são típicas dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Melloni et al. (2006), analisando as características culturais de bactérias diazotróficas nodulíferas de caupi, constataram que um grande número de isolados bacterianos apresentaram

maior similaridade com estirpes pertencentes a espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, de crescimento rápido e caráter acidificante, o que nos leva a deduzir que estes isolados possuem grande probabilidade de pertencerem a um desses gêneros. Campêlo (1976), em seu trabalho de caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais, obteve dados semelhantes, com predominância da produção de muco em estirpes de crescimento rápido.

Aproximadamente 13% dos isolados apresentaram crescimento intermediário, produzindo pouco muco e alcalinizando o meio (M016, M022, M024, M30 e M033) e, praticamente 8% destes, apresentaram crescimento lento, produção de muco moderada e também alcalinizaram o meio (M008, M014 e M028) e finalmente, 5% cresceram lentamente, produziram pouco muco e não alteraram o meio de cultura (M002 e M005). Jordan (1984) relata que as bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* formam um grupo numeroso de estirpes com crescimento intermediário a lento, comum nas regiões tropicais, como é o caso dos isolados obtidos neste estudo, justificando a presença de isolados de crescimento intermediário a lento (aproximadamente 26%).

Estas características são parâmetros que devem ser comparados e correlacionados entre si. Assim, por exemplo, colônias menores em geral são translúcidas e produzem pouco muco. Já as que são maiores, tendem a produzir grande quantidade de muco (MARTINS, 1996; MARTINS et al., 1997b), como as verificadas no presente estudo, havendo geralmente relação direta entre a velocidade de crescimento e a produção de muco.

Outro fato a ser considerado é a relação entre o tamanho da colônia e as suas características na habilidade de fixação simbiótica de nitrogênio (ALLEN & ALLEN, 1950). Segundo pesquisa relatada por Herridge & Roughley (1975), em geral, colônias grandes e com produção volumosa de muco, são simbioticamente pouco eficientes.

Agrupamento dos isolados

De acordo com o dendrograma de similaridade, é possível observar a existência de 3 grupos distintos de bactérias, formados de acordo com as

características morfológicas em nível de similaridade de 15% para os isolados de *Macroptilium lathyroides* (Figura 6).

Dos grupos obtidos, pode-se observar que o grupo III reuniu uma grande quantidade de isolados, ou seja, 20 no total (Figura 6).

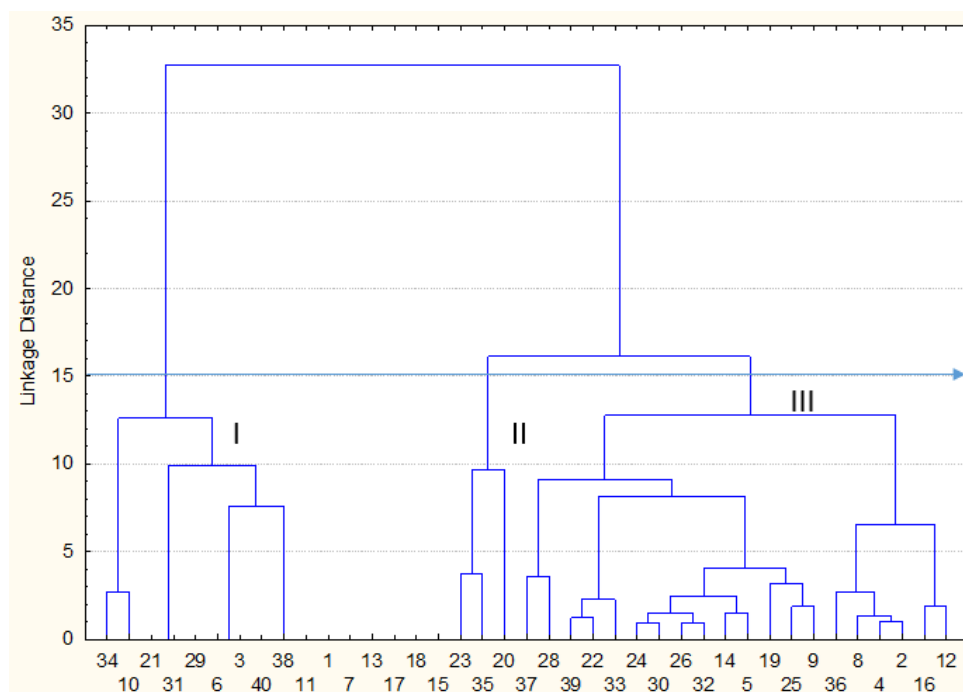


Figura 6. Dendrograma de isolados de rizóbio obtidos de raízes de *Macroptilium lathyroides*, por caracterização fenotípica e formação de grupos com características semelhantes, coletados no município de Alta Floresta – MT.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise de componentes principais, com os autovalores e os coeficientes de correlação para a verificação de formação dos grupos observados na análise de agrupamento hierárquico. Os resultados indicam que aproximadamente 28% da variabilidade total foi explicada pelo primeiro componente principal (CP1). Por sua vez, o segundo componente principal (CP2) explicou aproximadamente 23% da variabilidade, com valor acumulado de aproximadamente 51% da variabilidade contida nos dados originais. O terceiro componente principal (CP3) explicou aproximadamente 11% da variabilidade total dos dados.

Desta maneira, a somatória dos três componentes principais é responsável por aproximadamente 62% da variabilidade contida no conjunto

original dos dados. A quantidade de variação foi suficiente para a geração de três agrupamentos, observados na análise de agrupamentos hierárquicos.

Tabela 3. Autovalores, quantidade de variação explicada, coeficientes de correlação e autovetores entre isolados de rizóbios de plantas de *Macroptilium lathyroides*.

| Componentes | PC1 | PC2 | PC3 |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Autovalor | 3,103002 | 2,536786 | 1,246715 |
| Acumulativo | 3,10300 | 5,63979 | 6,88650 |
| % Total | 28,20911 | 23,06169 | 11,33377 |
| Acumulativo | 28,2091 | 51,2708 | 62,6046 |
| Coordenadas fatoriais das variáveis, baseadas em correlações (<i>Macroptilium lathyroides</i>) | | | |
| Crescimento | -0,789961 | -0,139977 | -0,291305 |
| Diâmetro | -0,408323 | -0,534475 | -0,129201 |
| Cor | 0,516073 | 0,696599 | -0,205930 |
| Elevação | 0,333336 | -0,733610 | 0,318261 |
| Borda | -0,463656 | 0,422065 | 0,545418 |
| Transparência | -0,109680 | 0,605652 | 0,282816 |
| Superfície | 0,437892 | -0,650006 | -0,229536 |
| Muco | 0,808475 | 0,008860 | -0,092064 |
| Consistência | -0,198772 | 0,446279 | -0,659025 |
| Elasticidade | -0,331166 | -0,077426 | -0,348701 |
| pH | -0,844526 | -0,188135 | 0,083259 |

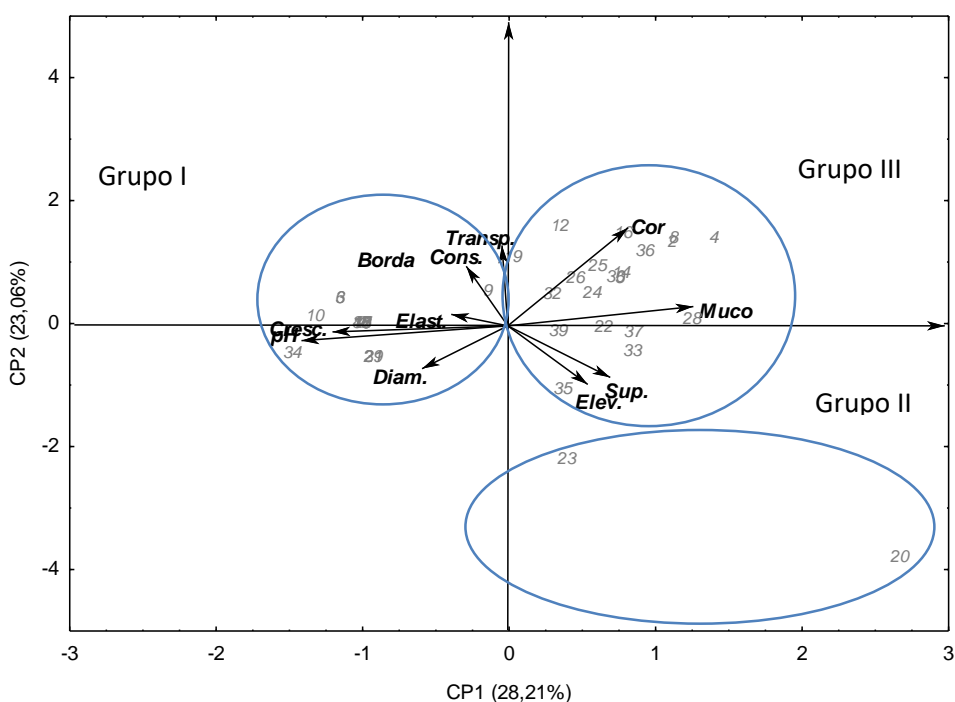


Figura 7. Gráfico biplot dos componentes principais 1 e 2 da análise de componentes principais com as características morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de *Macroptilium lathyroides*.

O gráfico biplot permitiu verificar a correlação das variáveis com os componentes principais (Figura 7), indicando a formação dos agrupamentos. O poder discriminatório das variáveis dentro de um componente principal foi medido pelos coeficientes de correlação lineares entre cada variável e o respectivo componente principal.

Pode-se inferir que, para o componente principal CP1 e por ordem de importância, os atributos que apresentaram os maiores coeficientes de correlação foram: pH (-0,84), muco (0,81), tempo de crescimento (-0,79) e cor (0,52). Os valores aproximados encontram-se na Tabela 3.

Estes componentes são interpretados como sendo as principais características morfológicas que levaram ao agrupamento dos isolados, de uma maneira geral, os isolados contidos nesse grupo I (Figura 7) apresentam coloração amarela, crescimento rápido, muco abundante e acidificaram o meio de cultura.

Os gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, possuem a capacidade de modificar o pH do meio de cultura 79, tornando ele ácido (COUTINHO et al., 2000). Esses dados são um indicativo que o grupo I possa ser composto por bactérias do gênero *Rhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Sinorhizobium*, pois apresentaram coloração amarela, acidificaram o meio de cultura, tiveram crescimento rápido e produção de muco. Essas bactérias observadas se enquadram perfeitamente com o que foi sugerido por Sprent (1994). Este autor relata que bactérias de crescimento rápido, comuns em regiões áridas, não são boas fixadoras de N₂, pois a prioridade desses organismos é a sobrevivência. Entretanto, Martins et al. (1997) relatam que diversas estirpes de crescimento rápido vivem em regiões tropicais, como é o caso da região Amazônica, local de coleta deste estudo.

Para o componente principal CP2, os índices que apresentaram maiores coeficientes de correlação foram: elevação (-0,73), cor (0,70), superfície (0,61), transparência (0,61) e diâmetro (0,53), valores aproximados (Tabela 3 e Figura 7). Destes componentes, a elevação da colônia bacteriana foi o principal indicador usado para agrupar os isolados. O grupo II foi composto por 3 isolados que apresentaram elevação tipo lente. Araújo & Gualter (2017), estudando bactérias nativas de solos do cerrado, relatam ter

isolado 3 estirpes de bactérias com elevação da colônia tipo lente, mesmo à semelhança do número de isolados obtidos nesta pesquisa.

Para o CP3, os índices que apresentaram maiores coeficientes de correlação foram: consistência do muco (-0,66) e borda (0,54). (Tabela 3 e Figura 7). Estes componentes são interpretados como sendo as principais características morfológicas que levaram ao agrupamento dos isolados. De uma maneira geral, os isolados contidos nesse grupo III apresentaram coloração creme para branca e a maioria apresentou produção de muco viscoso e borda inteira.

O gênero *Bradyrhizobium* caracteriza-se por apresentar colônias opacas, circulares, apresentando-se ocasionalmente translúcidas ou brancas, e tendem a alcalinizar ou manter o pH neutro (JORDAN, 1984; ARAÚJO, 1994; HOLT et al., 1994; MELLONI et al., 2006). Esses dados são um indicativo de que as bactérias pertencentes ao grupo III (Figura 7) possam se enquadrar no gênero *Bradyrhizobium*, pois as características morfológicas assemelham-se.

Autenticação dos isolados

Conforme Tabela 4, observa-se que 19 isolados (M002, M004, M005, M008, M014, M016, M019, M022, M024, M025, M026, M028, M030, M032, M033, M035, M036, M037 e M039) apresentaram valores superiores aos demais isolados, especialmente para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de nódulo (MSN), massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO); mas sem apresentar diferença em relação ao tratamento “COM N”, porém diferenciando-se do tratamento “SEM N”.

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca total (MST), relação entre parte aérea e raiz (REL), de plantas de *Macropitilium lathyroides* inoculadas com isolados de rizóbio.

| Estirpes | MSPA (mg) | MSR (mg) | MSN (mg) | MST (mg) | RELAÇÃO |
|----------|-----------|----------|----------|----------|---------|
| M001 | 146,13 b | 89,03 a | 4,13 b | 235,16 b | 1,67 a |
| M002 | 215,86 a | 110,83 a | 16,40 a | 326,70 a | 1,89 a |
| M003 | 110,03 b | 66,16 a | 3,56 b | 176,20 b | 1,64 a |
| M004 | 270,36 a | 137,53 a | 10,10 a | 407,90 a | 1,97 a |
| M005 | 264,50 a | 119,03 a | 11,50 a | 383,53 a | 2,25 a |
| M006 | 68,06 b | 75,53 a | 0,50 b | 143,60 b | 0,89 b |
| M007 | 64,76 b | 60,06 a | 8,90 a | 124,83 b | 1,08 b |
| M008 | 267,36 a | 114,76 a | 11,06 a | 382,13 a | 2,30 a |
| M009 | 124,90 b | 97,46 a | 3,76 b | 222,36 b | 1,27 b |
| M010 | 177,46 b | 91,33 a | 7,36 a | 268,80 b | 1,72 b |
| M011 | 68,20 b | 50,50 a | 0,86 b | 118,70 b | 1,43 b |
| M012 | 163,20 b | 63,83 a | 8,30 a | 227,03 b | 3,86 a |
| M013 | 106,80 b | 89,90 a | 4,83 b | 196,70 b | 1,14 b |
| M014 | 213,63 a | 101,66 a | 8,00 a | 315,30 a | 2,24 a |
| M015 | 101,40 b | 82,63 a | 2,10 b | 184,03 b | 1,21 b |
| M016 | 193,26 a | 85,73 a | 7,40 a | 279,00 a | 2,37 a |
| M017 | 163,23 b | 94,20 a | 4,13 b | 257,43 b | 1,67 a |
| M018 | 99,53 b | 74,53 a | 5,73 b | 174,06 b | 1,33 a |
| M019 | 244,96 a | 119,06 a | 11,23 a | 364,03 a | 2,05 a |
| M020 | 141,80 b | 110,10 a | 6,93 b | 251,90 b | 1,14 b |
| M021 | 73,50 b | 59,36 a | 3,60 b | 132,86 b | 1,25 b |
| M022 | 270,73 a | 111,46 a | 12,76 a | 382,20 a | 2,29 a |
| M023 | 132,00 b | 84,26 a | 5,00 b | 216,26 b | 1,64 a |
| M024 | 269,10 a | 134,70 a | 14,6 a | 403,80 a | 2,01 a |
| M025 | 255,56 a | 106,23 a | 6,30 a | 361,80 a | 2,42 a |
| M026 | 240,13 a | 131,06 a | 13,60 a | 371,20 a | 1,79 a |
| M028 | 239,56 a | 117,53 a | 8,23 a | 357,10 a | 2,13 a |
| M029 | 136,43 b | 79,63 a | 1,86 b | 216,06 b | 1,54 b |
| M030 | 209,33 a | 105,36 a | 10,00 a | 314,70 a | 1,97 a |
| M031 | 90,30 b | 80,06 a | 2,23 b | 170,36 b | 1,12 b |
| M032 | 192,20 a | 91,70 a | 7,50 a | 283,90 a | 2,20 a |
| M033 | 274,33 a | 127,76 a | 11,36 a | 402,10 a | 2,14 a |
| M034 | 130,06 b | 67,46 a | 1,10 b | 197,53 b | 1,85 a |
| M035 | 265,06 a | 103,86 a | 14,26 a | 368,93 a | 2,46 a |
| M036 | 285,13 a | 146,83 a | 13,00 a | 431,96 a | 1,96 a |
| M037 | 246,30 a | 104,76 a | 8,23 a | 351,06 a | 2,54 a |
| M038 | 125,13 b | 74,56 a | 10,30 a | 199,70 b | 1,68 a |
| M039 | 183,23 a | 88,46 a | 8,16 a | 271,70 a | 2,06 a |
| M040 | 205,30 a | 106,46 a | 8,96 a | 311,76 b | 1,57 b |
| SEM N | 99,23 b | 85,43 a | 0,00 b | 184,66 b | 1,15 b |
| COM N | 256,23 a | 121,46 a | 0,00 b | 377,70 a | 2,22 a |
| c.v. (%) | 10,03 | 10,09 | 10,07 | 8,37 | 15,43 |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se que 19 isolados apresentaram diferença para a variável MSPA se comparados com demais isolados e com o tratamento SEM N

(Tabela 4). Estes isolados não se diferenciaram do tratamento COM N, porém foram capazes de incrementar a MSPA, da mesma maneira, Vargas et al. (1990) e Vieira et al. (1994), trabalhando com isolados inoculados em feijão, observaram aumento de MSPA em plantas sem diferirem estatisticamente das com aplicação de N.

Estes isolados aparentemente apresentam grande potencial para fixação de nitrogênio, sendo indicados para teste de eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Antunes (2010) trabalhando com feijão fava (*Phaseolus lunatos* L.) relata resultados semelhantes para MSPA, em que uma grande quantidade de isolados não apresentaram se diferenciaram do tratamento com nitrogênio.

Além dos efeitos de estímulo ao crescimento vegetal que as espécies de bactérias promotoras de crescimento podem atuar nas relações entre rizóbio e leguminosa, podemos citar o desenvolvimento de raízes laterais e alongamento de raízes primárias. Assim, este crescimento está associado ao nível populacional da espécie microbiana associada, refletindo diretamente na quantidade de fitormônio disponibilizado à planta, afetando a promoção ou a inibição do crescimento das raízes (PATTEN & GLICK, 1996).

O nível populacional de bactérias na rizosfera das plantas estudadas não foi alto suficiente para permitir o aumento do desenvolvimento radicular de *Macropitilium lathyroides*, uma vez que o substrato foi esterelizado. De maneira semelhante, Antunes (2010) e Souza (2015) estudando rizóbios em feijão caupi verificaram que MSR não apresentou diferença entre os tratamentos, corroborando para com os dados aqui apresentados.

Não houve diferença para MSR entre os isolados e os tratamentos COM N e SEM N. Estes resultados sugerem que os isolados não exerceram influência sobre o crescimento radicular de *M. lathyroides*, assemelhando-se à pesquisa de Antunes et al. (2011) com isolados de rizóbio em feijão fava.

Outras pesquisas também tem obtido resultados semelhantes para MSN, tais como os de Souza (2015), e Fernandes et al. (2003) que, trabalhando com feijão guandu e caupi, relatam diferença entre estirpes de rizóbios quanto a capacidade de promover o crescimento vegetativo (MSPA) e à nodulação (MSN).

Nas bactérias do grupo rizóbio, a síntese de auxinas e a alteração da relação entre auxinas e citocininas está relacionada diretamente com a capacidade de iniciação da formação de nódulos na planta. Assim, os mecanismos genéticos de regulação da biossíntese de auxina por bactérias como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, tem sido relacionados com funções que influenciam positivamente a fisiologia e o desenvolvimento da planta hospedeira (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995).

Apesar da predominância de isolados com coloração amarela, crescimento rápido e com capacidade de acidificação do meio de cultura, os isolados brancos a creme, com crescimento intermediário a lento, com pouca produção de muco e capacidade de alcalinizar o meio de cultura foram os mais eficientes (M002, M004, M005, M008, M014, M016, M019, M022, M024, M025, M026, M028, M030, M032, M035, M036, M039), pois apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas, sem apresentar diferença entre eles. Apenas um isolado eficiente (M033) apresentou coloração amarela e crescimento rápido, porém com capacidade de alcalinizar o meio de cultura.

Todos os isolados apresentaram capacidade de nodular as plantas. Dados semelhantes foram relatados por Rufini (2013) em feijão guandu, em que todas as estirpes testadas foram capazes de nodular. Esta capacidade de nodular pode ser perdida após o processo de isolamento e estocagem das bactérias, principalmente para as que apresentam os genes da simbiose em plasmídeos, como os rizóbios pertencentes à espécie *Rhizobium leguminosarum* (GARCÍA DE LOS SANTOS et al., 1996). Neves & Rumjanek (1998) afirmam que fatores como a temperatura e o pH do solo determinam o sucesso da estirpe no que tange a eficiência de nodulação.

Quanto à eficiência relativa (ER) dos isolados calculada e comparando-se com o tratamento COM N e sem inoculação (Figura 8), verifica-se que 8 isolados (M004, M005, M008, M022, M024, M033, M035 e M036) obtiveram ER maior que o tratamento COM N. Isso pode indicar que os isolados apresentaram capacidade de fornecer maiores quantidades de nitrogênio para a parte aérea da planta do que o tratamento com nitrogênio. O isolado M025 apresentou ER similar ao observado no tratamento com fornecimento de nitrogênio.

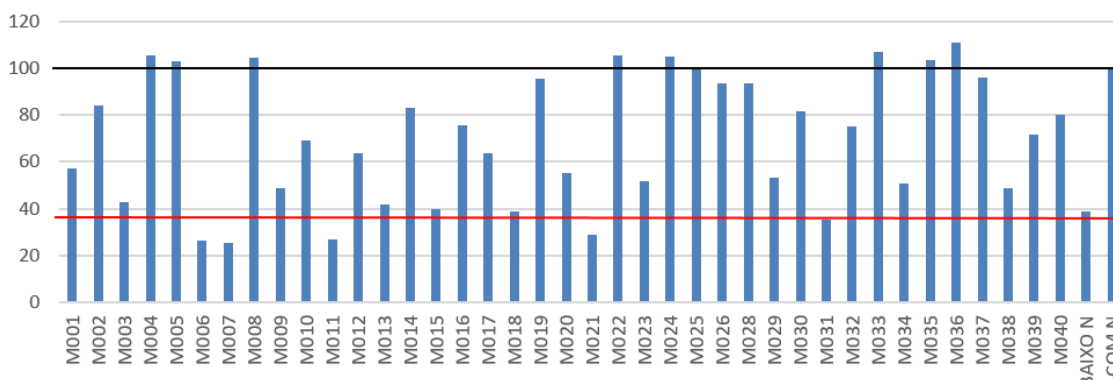


Figura 8. Eficiência relativa (ER) da produção de massa seca da parte aérea apresentada por plantas de *Macroptilium lathyroides* inoculadas com isolados de rizóbio obtidos de raízes de *Macroptilium lathyroides* em solos da região periurbana e rural do município de Alta Floresta - MT.

Resultados semelhantes foram relatados por Gualter et al. (2011) e Chagas Júnior et al. (2010) com isolados em feijão caupi, obtendo isolados com elevada ER, acima do tratamento com N. Nascimento et al. (2010) relatam semelhança, com valores na ordem de 80% para ER.

Dos isolados avaliados (Figura 8), cinco deles apresentaram ER inferior ao tratamento SEM N. Já em 24 isolados o ER foi maior que o tratamento SEM N, porém, menor que o tratamento COM N. Cassetari (2010) trabalhando com isolados da Mata Atlântica, observou que as bactérias avaliadas não foram capazes de superar o tratamento com nitrogênio. Esses resultados são diferentes dos obtidos no presente estudo, pois foram obtidos isolados com capacidade de produzir quantidades superiores de MSPA em relação às plantas controle COM N.

Sequenciamento dos isolados de *Macroptilium lathyroides*

Das estirpes selecionados para identificação genética pelo sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA, não foi possível realizar a identificação de três deles (M014, M019 e M033). Estes isolados não identificados não apresentaram semelhança, possivelmente devido à quantidade de pares de bases contidas nas amostras, que não foram suficientes para a identificação destes.

As estirpes de nódulos de raízes de *M. lathyroides*, denominados M16, M22, M24 e M36, apresentaram crescimento intermediário a lento, coloração branco para creme, pouca produção de muco e alcalinizaram o meio de cultura, conforme indicado na caracterização morfológica, no dendrograma de similaridade e no biplot. A análise da sequência do gene 16S rRNA das estirpes citadas, indicou similaridade variando de 81 a 92% com a espécie *Bradyrhizobium* (Tabela 5). Esses resultados corroboram com o que foi observado na análise morfológica e agrupamento das estirpes. O *Bradyrhizobium namibiense* foi proposto como nova espécie recentemente por Grönemeyer et al. (2017) estudando estirpes em feijão de cheiro. Porém a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Assim, é possível afirmar que as estirpes isoladas podem corresponder a indivíduos ainda não identificados, justificando a necessidade de novos estudos com essas estirpes.

Tabela 5. Identificação genética por sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA de isolados de nódulos de raízes de *Macroptilium lathyroides*.

| Isolado | Identificação do isolado | Nº Geral | % de ident. | Nº de acesso |
|---------|-------------------------------------|----------|-------------|--------------|
| M002 | <i>Mucilaginibacter gossypicola</i> | 1249 | 97% | NR_116406.1 |
| M004 | <i>Novosphingobium arabidopsis</i> | 625 | 84% | NR_133799.1 |
| M005 | <i>Bacillus haynesii</i> | 1332 | 99% | NR_157609.1 |
| M016 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 442 | 81% | NR_159233.1 |
| M022 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 326 | 82% | NR_159233.1 |
| M024 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 730 | 85% | NR_159233.1 |
| M028 | <i>Flavobacterium anhuiense</i> | 1375 | 100% | NR_044388.1 |
| M035 | <i>Bacillus xiamenensis</i> | 1129 | 95% | NR_148244.1 |
| M036 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 1048 | 92% | NR_159233.1 |

A estirpe M002 apresentou coloração branca, pouca produção de muco e manteve o pH do meio de cultura neutro. Esta estirpe apresentou similaridade de 97% com estirpes do gênero *Mucilaginibacter* (Tabela 5).

O gênero *Mucilaginibacter*, membro da família Sphingobacteriaceae, apresentam ação no o crescimento de plantas. Estas bactérias podem

promover esse benefício direta ou indiretamente através da produção de fitormônios ou de enzimas que otimizem o crescimento das plantas, permitindo o aumento da absorção de nutrientes (STEYN et al., 1998; GLICK et al., 1999; ; WHIPPS, 2001; PANKRATOU et al., 2007). Segundo Madhaiyan et al. (2010), a presença da espécie *Mucilaginibacter gossypiiicola* foi relacionada ao maior crescimento de plantas de algodão.

A estirpe M004 apresentou coloração branca, pouca produção de muco, alterando o pH do meio de cultura para alcalino. A análise da sequência do gene 16S rRNA da estirpe apresentou similaridade de sequenciamento entre pares e tipo de linhagem de 84% com o gênero *Novosphingobium* (Tabela 5). Segundo Lin et al. (2014), a bactéria *Novosphingobium* é resistente ao DDT, sendo encontrada na rizosfera de *Arabidopsis thaliana* (mostarda). Vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduos ainda não identificados, sendo também indicado estudos complementares.

A estirpe M005 apresentou coloração branca, pouca produção de muco e manteve o pH do meio de cultura neutro. O isolado apresentou similaridade de 99% com *Bacillus haynessi* (Tabela 5). Danlap et al. (2017), em um levantamento de biodiversidade de cepas do gênero *Bacillus*, propôs o reconhecimento do *Bacillus haynessi* como nova espécie, o mesmo aqui identificado.

A estirpe M035 apresentou coloração amarela, produção abundante de muco e pH ácido, conforme indicado na caracterização morfológica. A análise da sequência do gene atingiu similaridade de 95% com o gênero *Bacillus*. Lai et al. (2014) identificaram *B. xiamenses* no trato intestinal de peixes, porém não foi encontrado na literatura relatos de interação com plantas.

Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio

Como podemos observar no quadro de análise de variância (Tabela 6), as variáveis comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) não apresentaram efeito significativo em função dos tratamentos.

Os isolados avaliados não apresentaram diferença para os fatores analisados. Assim, podemos afirmar que os isolados não foram capazes de influenciar nos atributos de crescimento da parte aérea e de raiz.

Tabela 6. Tabela de análise de variância para os fatores comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) de plantas de *Macroptilium lathyroides* inoculadas com diferentes isolados.

| FV | GL | QM | | | | | | | |
|----------|----|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|--|
| | | CR | VR | MSR | CPA | MSPA | MST | RELAÇÃO | |
| Isolados | 20 | 40,3310 ns | 0,3429 ns | 0,0025 ns | 50,6669 ns | 0,0016 ns | 0,0016 ns | 1,4326 ns | |
| Resíduo | 63 | 34,5426 | 0,3842 | 0,0027 | 84,8722 | 0,0026 | 0,0026 | 1,2014 | |
| c.v.% | 83 | 16,77 | 21,98 | 20,44 | 17,36 | 10,26 | 9,71 | 23,44 | |

ns - não significativo.

Os rizóbios fornecem nitrogênio para as plantas e em contra partida estas produzem carboidratos oriundos da fotossíntese. Estudos apontam outros mecanismos pelos quais os rizóbios estimulam o crescimento vegetal e, entre estes mecanismos, destacam-se a produção de hormônios vegetais, principalmente as auxinas, responsáveis pelo aumento do sistema radicular e consequentemente da capacidade de absorção de nutrientes, a solubilização de fosfatos e a proteção ao ataque de fitopatógenos (BISWAS et al., 2000; CHEN et al., 2005; DUTTA et al., 2007; YANNI & DAZZO, 2010). A promoção do crescimento e o desenvolvimento de plantas inoculadas é atribuída à produção de ácido-indol-acético pelos rizóbios, que é o precursor inicial do triptofano (SPAEPEN et al., 2007). Provavelmente o solo usado no experimento apresentava uma comunidade de rizóbios nativos muito eficientes na FBN, sendo capazes de promover um bom desenvolvimento das plantas.

Como podemos observar no quadro de análise de variância (Tabela 7), o fator CONT N não apresentou diferença para as variáveis N^o de nódulos, MSN e IV, entretanto N houve significância de acordo com o teste f.

Tabela 7. Tabela de análise de variância para os fatores número de nódulos (N^o de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV), teor de nitrogênio(N) e conteúdo de nitrogênio (CONT N) de plantas de *Macroptilium lathyroides* inoculadas com diferentes isolados.

| FV | GL | QM | | | | |
|----------|----|---------------------------|------------|------------|-----------|-------------|
| | | N ^o de nódulos | MSN | IV | N | CONT N |
| Isolados | 20 | 0,204437* | 0,000038ns | 7,256095ns | 26,68666* | 0,016226 ns |
| Resíduo | 63 | 0,033807 | 0,000029 | 5,50616 | 11,506756 | 0,02627 |
| c.v.% | 83 | 9,29 | 1,72 | 6,03 | 11,91 | 10,59 |

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste f.

ns - não significativo.

De modo geral, é possível afirmar que a relação entre o teor de nitrogênio foliar e o conteúdo de clorofila na folha é elevada (SCHADCHINA & DMITRIEVA, 1995; SMEAL & ZHANG, 1994). Essa relação se deve, em grande parte, ao fato de que até 70% do nitrogênio total das folhas fazem parte de enzimas associadas aos cloroplastos e que o nitrogênio faz parte da molécula da clorofila (CHAPMAN & BARRETO, 1997), ou seja, com papel fundamental na fotossíntese.

Para teor de nitrogênio, três estirpes (M004, M005 e M022) não apresentaram diferença em relação ao tratamento COM N (Tabela 8). Segundo Malavolta et al. (1999), uma concentração adequada de nitrogênio na folha seria de 36 g por kg, para a cultura da soja. Podemos observar que o tratamento COM N apresentou teor de nitrogênio equivalente para a cultura da soja, sendo que os isolados citados apresentaram teores próximos a esse valor.

Tabela 8. Número de nódulos (Nº Nódulos) e teor de nitrogênio na análise foliar (N) de plantas de *Macroptilim lathroides* inoculadas com isolados de rizóbio, os valores para N estão expressos em gramas por quilo.

| ISOLADO | Nº Nódulos | N |
|---------|------------|---------|
| M002 | 80,17 a | 29,30 b |
| M004 | 108,19 a | 31,40 a |
| M005 | 133,92 a | 32,15 a |
| M008 | 118,04 a | 29,17 b |
| M014 | 94,69 a | 27,67 b |
| M016 | 122,33 a | 28,77 b |
| M019 | 108,46 a | 28,70 b |
| M022 | 67,12 a | 30,45 a |
| M024 | 122,23 a | 24,95 b |
| M025 | 104,02 a | 26,42 b |
| M026 | 83,83 a | 27,17 b |
| M028 | 131,16 a | 27,72 b |
| M030 | 100,00 a | 24,85 b |
| M032 | 147,25 a | 28,72 b |
| M033 | 95,60 a | 27,40 b |
| M035 | 125,66 a | 26,80 b |
| M036 | 130,42 a | 28,37 b |
| M037 | 112,08 a | 25,07 b |
| M039 | 104,17 a | 28,65 b |
| SEM N | 114,16 a | 28,02 b |
| COM N | 14,66 b | 36,10 a |
| C.V.% | 9,29 | 11,91 |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a partir do estudo de isolados de rizóbios de raízes de *M. lathyroides* coletados da zona periurbana e rural do município de Alta Floresta - MT conclui-se que:

Os isolados apresentam grande diversidade fenotípica e com elevada frequência de isolados eficientes no teste de autenticação.

Há predominância de isolados de crescimento rápido, no entanto somente um isolado de crescimento rápido apresenta eficiência na fixação de nitrogênio.

As bactérias de crescimento intermediário e com pouca produção de muco são mais eficientes na fixação de nitrogênio, comparando com os outros isolados.

Foram identificadas, através de análise do sequenciamento do gene 16S rDNA, as seguintes bactérias: M002 - *Mucilaginibacter gossypiiicola*, M005 - *Bacillus haynesii*, M035 – gênero *Bacillus*, e M028 - *Flavobacterium anhuiense*.

As estirpes M004, M005 (*Bacillus haynesii*) e M022 apresentaram valores de teor de nitrogênio muito próximos ao do tratamento COM N, sendo indicados para novos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G. P. **Avaliação de acessos de *Desmanthus e Macroptilium* no Semiárido Pernambucano**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada. 2013.
- ALLEN, E. K.; ALLEN, O. N. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. **Botanical Review**, v.14, p.273-330, 1950.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.
- AMABILE, R. F.; CARVALHO, A. M. **Cerrado: Adubação Verde**. Embrapa Cerrados. Planaltina – DF. 2006. 369p.
- ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Piauí. 2010.
- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F. de.; LYRA, M. C. C. P. de.; FIGUEIREDO, M. V. B. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.3, p.751-757, 2011.
- ARAÚJO, S.R. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S.R. (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. cap.7, p.157-170.
- ARAÚJO, C. L. de; GUALTE, R. M. R. Caracterização morfofisiológica de bactérias nativas de solos do Cerrado isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Biotemas**, v.30, n.1, p.25- 35, 2017.
- BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G.; ROLFE, B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigos and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5, p.880-886, 2000.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. 2009. 399p.
- CAMPÊLO, A.B. **Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais**. 1976 122f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Itaguaí: UFRRJ. 1976.
- CASSETARI, A. S. **Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica**. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências com área de concentração em solos e nutrição de plantas). ESALQ/USP. Piracicaba. 2010.

- CONCENÇO, G.; CORREIA, I. V. T.; GALON, L. Controle de *Macropitium lathyroides* com herbicidas aplicados em pós-emergência inicial. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2012, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBCPD, p.18-22. 3129-3133.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytormones by pnat-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.1, p.1-18, 1995.
- COUTINHO, H. L.C.; OLIVEIRA, V. M.; MOREIRA, F. M. S. Systematics of legun nodule nitrogen fixing: agronomic and ecological applications. In: PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. **Applied Microbial Systematic**. Dordrecht: Kluwer, p 107-134, 2000.
- CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.1, p.161-169, 2010.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R. dos.; CHAGAS, L. L. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi no cerrado, Gurupi – TO. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, n.4, p.709-714, 2010.
- CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v.89, n.4, p.557-562, 1997.
- CHEN, X.; FENG, J.; HOU, B.; LI, F.; LI, Q.; HONG, G. Modulating DNA bending affects Nod D mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, v.33, n.8, p.2540-2548, 2005.
- DUTTA, S.; MISHRA, A.K.; DILEEP KUMAR, B.S. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeonpea through interaction of PGPR and rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.2, p.452-461. 2008.
- DUNLAP, C. A.; SCHISLER, D. A.; PERRY, E. B.; CONNOR, N. COHAN, F. M.; ROONEY, A. P. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n.8, p. 2720-2725, 2017.
- DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; PAULA, A. M.; MACEDA, A.; MATTANA, A. L. **Guia prático de biologia do solo**. Curitiba. SBCS/NEPAR. p.60-70. 2016.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 38p.1999.
- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A.; GOLDMAN, B.J. Patterns of diversity of cowpea-miscellany rhizobia from three

West African locations. In: GHAI, B.S. **Symbiotic nitrogen fixation**. Ludhiana: USG, v.1, p.119-125.1984.

EHRHARDT-BROCAODO, N. C. M.; STOCCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; FILHO, L. C. L. O.; SANTOS, J. C. P. Diversidade cultural, morfológica e genética de diazotróficos isolados de nódulos de bracinga. **Revista Árvore**, v.39, n.5, p.923-933, 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Página temática: Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília. 2016. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio>> Acessado em: 29 set 2017.

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York, John Wiley, 1993. 170p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão de porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842. 2003.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplasma com *Eucaliptus***. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p.109-112, 2014.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw – Hill Book, 145p. 1928.

GARCÍA DE LOS SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. Rhizobium plasmids in bactéria-legume interactions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, n.2, p.119-125, 1996.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Agronomic efficiency of rhizobia strains in cowpea cultivated in the Pre-Amazon region, in Maranhao state. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.3, p.303-308, 2011.

GUERRA, J. G. M.; ESPINDOLA, J. A. A.; PERIN, A.; TEIXEIRA, M. G.; ALMEIDA, D. L.; ASSIS, R. L. **Desempenho de leguminosas tropicais perenes como plantas de cobertura do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 20).

GRÖNEMEYER, J. L.; BÜNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of lablab purpures, hyacinth bean, in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n.12, p. 4884-4891, 2017.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting Bacteria**. Imperial College Press. London. 267p. 1999.

HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R. J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.38, p.19-27, 1975.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994. p.78 - 94.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M. ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa. p.45-59. 1994.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Base de dados**. Disponível em: <<http://inmet.gov.br/portal/>> Acesso em: 09 nov. 2018.

JORDAN, D.C. **Family III Rhizobiaceae**. In: KRIEGD, N.R.; HOLT, J.G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins: Baltimore. 1984. p. 234-256.

LAI, Q.; LIU, Y.; SHAO, Z. *Bacillus xiamenensis* sp. nov., isolated from intestinal tract contents of a flathead muller (*Mugil cephalus*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 99-107, 2014.

LANGE, A.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento pelo trigo do nitrogênio residual da crotalária (*Crotalaria juncea*) e da uréia aplicado ao solo em cultivo precedente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1715-1720, 2009.

LAWRIE, A.C. Relationships among rhizobia from native Australian native legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.1822-1828, 1983.

LIMA, A. S. **Densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o sirato (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia ocidental**. 2007. 167f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em solos e nutrição de plantas). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2007.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; HUANG, H, I; YOUNG, C. C. *Novosphigobium arabidopsis* sp. nov., a DDT-resistant bacterium isolated from the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n.2, p. 594-598, 2014.

MADHAIYAN, M.; POOMGUZHALI, S.; LEE, J. S.; SENTHILKUMAR, M.; LEE, K. C.; SUNDARAM, S. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton

rhizosphere soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, n.10, p. 2451-2457, 2010.

MALAVOLTA, E.; OLIVEIRA, S. A.; WADT, P. G. S. Foliar diagnosis: the status of the art. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, p. 205-242. 1999.

MARTINS, L. M. V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil**. 213f. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1996.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil, Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p. 1005-1010, 1997a.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio. Embrapa, **Comunicado Técnico**, n.9, 14p. 1997b.

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

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

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99. 2010a.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA. 367p. 2010b.

MONKS, P. L.; FERREIRA, O. G. L.; PÓLO, E. A.; SILVA, J. B. Produção e qualidade de sementes de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. sob diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.2, p 107-112, 2006.

NASCIMENTO, L. R. S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.5, n.1, p.36-42, 2010.

- NEVES, M.C.P.; RUMJANENK, N.G. **Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Embrapa- CNPMA: Jaguariúna. 1998. 486 p.
- PANKRATOV, T.A.; TINDALL, B. J.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov. sp. Nov. and *Mucilaginibacter grasilis* sp. Nov., pectin, xylan and laminarin degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphangum peat bog. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n.10, p.2349-2354. 2007.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis os índole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.3, p.207-220, 1996.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVEZ, V. H. V. **5ª Aproximação – recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa: UFV. 360p. 1999.
- RUFINI, M. **Eficiência de estirpes de Bradyrhizobium spp. em simbiose com gandu cvs fava larga e anão em condições diversas**. 78f. 2013. Tese (Doutorado em Ciências dos Solos). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SATURNO, D. F.; ANDRADE, D. S. Diversidade de rizóbios que nodulam bracatinga de solos cultivados e de floresta. **Uniciências**, v.19, n.1, p.26-30. 2015.
- SCHADCHINA, T. M.; DMITRIEVA, V. V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.7, p.1427-1437, 1995.
- SMEAL, D.; ZHANG, H. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.25, n. 9/10, p.1495-1503, 1994.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganismplant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, n.4, p.425-448, 2007.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-*rhizobium* symbiosis: chaos theory? **Plant and soil**, v.161, p.1-10, 1994.
- SILVA, L. L.; PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Diversidade de rizóbios da unidade de conservação de Ubajara no Estado do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p.21-26, 2014.
- SILVA, M. S. A.; YAMASHITA, O. M.; ROSSI, A. A. B.; CONCENÇO, G.; CARVALHO, M. A. C.; FELITO, R. A. Cytotoxic and genotoxic effects of *Macropitium lathyroides*. **Planta Daninha**, v.36, p.1-8. 2018a.

SILVA, M. S. A.; YAMASHITA, O. M.; ROSSI, A.A.B.; KARSBURG, I.V.; CONCENÇO, G.; FELITO, R. A. Potencial alelopático do extrato aquoso das folhas e raízes frescas de *Macroptilium lathyroides* na germinação e no desenvolvimento inicial de alface. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.16, n.1, p.89-95, 2018b.

SOUSA, L. M. G.; GOIS, R. W. S.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADENETO, M.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G. Constituintes químicos e avaliação da atividade antibacteriana de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. (Fabaceae). **Química Nova**, v.36, n.9, p.1370- 1374, 2013.

SOUZA, A. C. M. **Seleção de rizóbios e compatibilidade em diferentes variedades de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. 67f. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2015.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.846-849, 1994.

STATSOFT, INC. **Statistica data analysis software system, version 10**. 2011. Disponível em: <https://www.statsoft.com>. Acesso em: 12 dez. 2018.

STEYN, P. L.; SEGERS, P.; VANCANNEYT, M.; SANDRA, P.; KERSTERS, K.; JOUBERT, J.J. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 1, p.165-177,1998.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P. do.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p. 1107-1120, 2008.

TAN. K. P.; BROUGHTON W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.389-393, 1981.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, D. M. N.; FAVERO, C. Produção de fitomassa e acúmulo de nutrientes em leguminosas arbustivas, no município de Turmalina – MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.4520-4523, 2009.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.249-266, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 10 ed. Artmed: Porto Alegre. 167-170p. 2012.

VARGAS, A. A. T.; ATHAYDE, J. T.; SILVEIRA, J. S. M. Inoculação com rizóbios, adubação com macro e micronutrientes, e parcelamento do N-mineral aplicados no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Bioscience Journal**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1990.

VASCONCELOS, W. A.; SANTOS, E. M.; ANDRADE, A. P.; BRUNO, R. L. A.; EDVAN, R. L. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de figo de pombo (*Macroptilium lathyroides*). **Revista Trópica**, v.5, n.1, p.3-11, 2011.

VIEIRA, R. F.; SALGADO, L. T.; VIEIRA, C. Rizóbio, molibdênio e cobalto na cultura do feijão no Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.41, n.238, p. 688-694, 1994.

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

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile Delta. **Plant and Soil**, v.336, n.9, p.129-142. 2010.

WHIPPS, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 1, p. 487-511, 2001.

3. CAPÍTULOS

3.2. EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ORIUNDAS DE NÓDULOS DE *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC.

Resumo – A *Alysicarpus vaginalis*, também conhecida como amendoinzinho, pode ser utilizada para compor pastagens, produzir feno e forragem, possui potencial na alimentação de equinos e bovinos e por ser leguminosa, associa-se com rizóbios nativos, fato que pode ser observado visualmente. Por apresentar nodulação abundante, a planta apresenta indicativo de potencial para fixação biológica de nitrogênio. Assim sendo o objetivo do presente trabalho foi estudar a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam a espécie leguminosa *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. Para tanto foram coletadas raízes de *A. vaginalis* em áreas de ocorrência natural das espécies na zona rural e periurbana do município de Alta Floresta. As raízes que apresentaram nodulação foram lavadas, seus nódulos retirados, desinfestados e inoculados em meio de cultura 79 em placas de Petri. Estas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) no escuro por 28 °C por 10 dias, após esse período as colônias foram purificadas pelo método de esgotamento por estrias. A caracterização morfológica em placa foi realizada após o isolamento das estirpes e os dados foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência das características, sendo posteriormente utilizados para construção de um dendrograma de similaridade. Foi possível observar a existência de 4 grupos distintos de bactérias com similaridade de 15%. O experimento de autenticação foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao LaSeM na Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta e permitiu observar que dos 54 isolados, 13 deles apresentaram valores superiores, se comparado com os outros tratamentos, para massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, massa seca total, sem apresentar diferença estatística sobre eles. O sequenciamento do gene 16S rDNA, permitiu identificar as seguintes bactérias que colonizam raízes de *A. vaginalis*: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus*, e *Paenibacillus catalpae*. No teste de eficiência de fixação de nitrogênio as estirpes A018, A027 e A051 apresentam potencial para novos estudos, apenas a estirpe A051 apresentou diferença significativa para o fator teor de N elevado.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, amendoinzinho, isolados, nodulação.

Abstract – *Alysicarpus vaginalis*, also known as peanut, can be used to compose pastures, produce hay and fodder, has potential in the feeding of horses and cattle and because it is a legume, it is associated with native rhizobia, a fact that can be observed visually. Due to abundant nodulation, the plant presents indicative of potential for biological nitrogen fixation. This being the objective of the present work was to study the efficiency and diversity of nitrogen fixing bacteria that colonize the leguminous species *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. For this purpose *A. vaginalis* roots were collected in areas of natural occurrence of the species in the rural area and periurban area of the municipality of Alta Floresta. The roots that showed nodulation were washed, their nodules removed, disinfested and inoculated in culture medium in Petri dishes. These were incubated in the germination chamber (BOD) in the dark at 28°C for 10 days, after which time the colonies were purified by the streak-out method. The morphological plaque characterization was performed after isolating the strains and the data were converted into a binary matrix of presence and absence of the characteristics, being later used to construct a dendrogram of similarity. It was possible to observe the existence of 4 distinct groups of bacteria with similarity of 15%. The authentication experiment was carried out in a greenhouse belonging to LaSeM at the University of the State of Mato Grosso, Alta Floresta Campus and allowed to observe that of the 54 isolates, 13 of them presented higher values, when compared to the other treatments, for dry mass of aerial part, dry mass of root, total dry mass, without presenting statistical difference on them. Sequencing of the 16S rDNA gene allowed to identify the following bacteria that colonize *A. vaginalis* roots: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus*, and *Paenibacillus catalpae*. In the nitrogen fixation efficiency test the strains A018, A027 and A051 present potential for new studies, only strain A051 presented a significant difference for the factor of high N content.

Key words: Diazotrophic bacteria, peanut, isolated, nodulation.

INTRODUÇÃO

Alyscarpus vaginalis, também conhecida como amendoinzinho, é uma espécie perene originária da Índia que se propaga apenas por sementes. No Brasil infesta lavouras anuais e perenes, pomares, beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI, 2000). É utilizada para compor pastagens, produzir feno e forragem e/ou como estratégia para controle de erosão (NATIONAL PLANT DATA CENTER, 2000). No Mato Grosso, sua ocorrência vem aumentando tanto em áreas urbanas como em locais de cultivo em zonas rurais (GUIMARÃES et al., 2010).

A espécie apresenta potencial de utilização na alimentação de equinos e ovinos, pois a palatabilidade e aceitação são similares ao da alfafa (COOK et al., 2005). Além disso, apresenta nódulação radicular em abundância (NETO et al., 2016), sendo um indício que a planta tenha potencial na fixação de nitrogênio.

O nitrogênio é um dos nutrientes que apresenta maior demanda pelas culturas, sua presença na matéria orgânica do solo é limitada, podendo ser esgotada rapidamente após alguns cultivos. As condições de altas temperaturas e umidade em excesso, que são predominantes no território brasileiro, aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica e conseqüentemente de perdas do nutriente, resultando em solos com baixos teores de nitrogênio (HUNGRIA, 2001).

Os organismos procaríotos são capazes de assimilar o nitrogênio atmosférico e convertê-lo em forma amoniacal, que é assimilável pela planta (REIS et al., 2006). Desta maneira, os microorganismos fixadores conseguem garantir um reservatório inesgotável desse nutriente. Permitindo a redução de aplicações excessivas de adubos nitrogenados (PEOPLES & CRASWELL, 1992).

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por diversos grupos filogenéticos bacterianos, denominados diazotróficos, conhecidos genericamente por rizóbios (WALLEY & STEPHENS, 2002; SILVEIRA & FREITAS, 2007). Essas bactérias são capazes de induzir a formação de nódulos nas raízes das plantas, possuem a capacidade de se associar a uma

grande quantidade de espécies vegetais (HER et al., 1989; VARGAS et al., 1994; HUNGRIA, 2001; MOREIRA et al., 2010; TORTORA et al., 2012).

Assim sendo, a utilização de adubos verdes com capacidade de fixar nitrogênio de maneira eficiente, representa uma grande contribuição para a viabilidade econômica dos sistemas agrícolas (BODDEY et al., 1997), principalmente pela redução da utilização de adubos sintéticos.

Desta maneira o uso de espécies com essa capacidade simbiótica, mesmo vistas como plantas daninhas, tal como a *A. vaginalis*, tem potencial de uso como adubos verdes. Cultivados da maneira e época adequadas aos sistemas de cultivo, seriam uma alternativa promissora sob os aspectos técnico e econômico. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi estudar a eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam a espécie leguminosa *Alysicarpus vaginalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de nódulos de *Alysicarpus vaginalis*

As raízes de *A. vaginalis*, foram coletadas em áreas de ocorrência natural das espécies na zona rural e periurbana do município de Alta Floresta - MT, situado no extremo norte do Estado de Mato Grosso, sudeste da Floresta Amazônica, latitude 9° 52' 32" S, longitude 56° 05' 10" W e altitude 288 metros (INMET, 2016).

O clima do município de Alta Floresta é classificado como do tipo Am (tropical úmido ou subúmido), com temperatura média superior à 24 °C e precipitação de 2.800 a 3.100 mm (ALVARES et al., 2013).

O procedimento de coleta de raízes foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Hungria (1994). Foram coletadas amostras aleatórias de 20 plantas. As raízes foram retiradas do solo de maneira a manter o mais intacto possível o sistema radicular, removendo o excesso de solo e retirando a parte aérea, com auxílio de uma pá de jardim e uma tesoura de poda.

As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas em caixa de isopor e imediatamente levadas para o Laboratório de Tecnologia de Sementes e Matologia (LaSeM) da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta-MT.

Isolamento de estirpes bacterianas

As raízes coletadas foram lavadas e, as que apresentavam nodulação, foram envolvidas em papel toalha para retirada do excesso de água e, com auxílio de uma tesoura de poda foram fragmentadas em partículas menores a fim de facilitar a retirada do inóculo do interior do nódulo. Foram retirados cinco nódulos por sistema radicular.

Para desinfecção e purificação dos nódulos, foi adotada a metodologia proposta por Hungria (1994). Cada nódulo foi submerso em álcool 95% por dez segundos, na sequência em solução de hipoclorito a 2,5% por 3 minutos e, posteriormente foi procedida a lavagem em água destilada e

esterilizada por oito vezes. Os nódulos foram macerados e posteriormente inoculados em meio de cultura YMA em placas de Petri (VICENT, 1970).

O meio de cultura YMA foi composto de, 10g de manitol, 0,1 g de solução de fosfato de potássio dibásico, 0,4 g de solução de fosfato de potássio monobásico, 0,2 g de solução de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,1 g de solução de cloreto de sódio, 0,4 g extrato de levedura, 5 mL de solução de azul de bromotimol (0,5% de azul de bromothimol dissolvidos em 0,2 molL⁻¹ de KOH) e 15 g de ágar por litro para meio sólido (DÖBEREINER et al., 1999; FRED & WAKSMAN, 1928).

As placas foram incubadas em câmara de germinação (BOD) no escuro a 28 °C por 10 dias. As culturas foram purificadas pelo método de esgotamento por estrias conforme Tortora (2012). Uma alça de platina flambada foi utilizada para retirar as culturas mistas das placas de Petri onde o isolado do nódulo foi incubado, as colônias foram semeadas em estrias na superfície do meio de cultura 79 em placas de Petri. Ao longo da estria, as bactérias são depositadas a medida que a alça entra em contato com o meio de cultura. As últimas células depositadas na alça de platina foram afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas, permitindo repica-las e obter uma cultura pura contendo somente um tipo de bactéria (Figura 1).



Figura 1: Colônia pura isolada de nódulos de *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

Caracterização fenotípica

Características culturais

A caracterização morfológica em placa foi realizada após o isolamento das estirpes nas condições de temperatura de crescimento e meio de cultura descrito anteriormente (Figura 2): A seguir serão detalhadas as características morfológicas (MELLONI et al., 2006; DIONÍSIO et al., 2016):

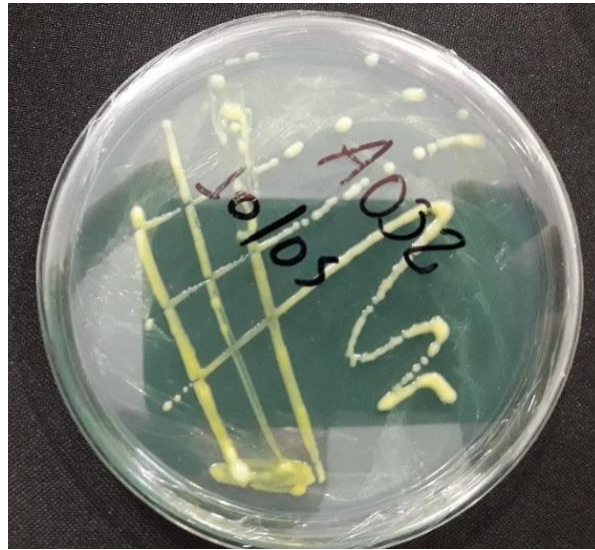


Figura 2: Placa utilizada na caracterização de isolado de nódulos de raízes de *Alyscarpus vaginalis*, com 10 dias de crescimento.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

- a) Tempo de crescimento: Após a repicagem dos isolados em placas de Petri contendo meio 79, foi considerado crescimento rápido, aquelas que puderem ser visualizadas com 2 a 3 dias de incubação; intermediário, com 4 a 5 dias de incubação; lentas, com 6 a 10 dias de incubação e muito lenta as colônias que podem ser visualizadas com mais de 10 dias de incubação. Após sete dias de incubação foram determinadas as demais características;
- b) Diâmetro das colônias: as bactérias foram agrupadas em diâmetro inferior a 1,0 mm e superior a esse valor;
- c) Coloração das colônias: foram caracterizadas quanto as cores: incolor, branca, creme, amarela, rosa, verde ou marrom;

- d) Forma da colônia: na determinação do formato das colônias foram consideradas as formas: Puntiforme, circular ou irregular;
- e) Elevação da colônia: foram considerados os formatos: Plana, lente, convexa, drop-like, umbanada ou umbilicada.
- f) Característica da Borda da colônia: foram determinadas como sendo: Inteira, ondulado, filamentosa, lobada, denteada ou nenhuma.
- g) Transparência da colônia: foram consideradas como opacas ou translúcidas.
- h) Características da Superfície da colônia: foram consideradas como rugosa, lisa ou papilosa;
- i) Produção de goma: As bactérias foram classificadas como de produção: escassa, pouco, moderada ou abundante;
- j) Consistência da goma: foi classificada como seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butílica;
- k) Elasticidade da colônia: foram classificada em elástica ou não elástica;
- l) Alteração do pH do meio: A coloração azul no meio de cultura foi considerada alcalina, coloração amarela como sendo ácido e a não alteração da cor original do meio (verde) como neutro, comparando os isolados com placas sem inoculação.

Agrupamento dos isolados por similaridade morfológica

Após a caracterização cultural dos isolados, com os dados obtidos com a morfologia de colônias bacterianas, foi construído um dendrograma de similaridade por distância Euclidiana, as variáveis foram analisadas como multicategóricas binárias e análise de componentes principais, realizada a fim de definir as características de maior contribuição para o estudo de diversidade das estirpes, os dados foram utilizados para agrupar as estirpes pela similaridade morfológica, permitindo verificar grupos de indivíduos semelhantes. O dendrograma foi confeccionado pelo método Ward's com auxílio do software Statistica (STATSOFT, INC., 2011).

Autenticação dos isolados

A capacidade de nodulação foi verificada seguindo-se a metodologia proposta por Everitt (1993). O experimento para essa autenticação foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao LaSeM na Universidade do Estado de Mato Grosso, campus universitário de Alta Floresta.

As sementes de *A. vaginalis* foram submetidas a quebra de dormência com ácido sulfúrico P.A. por 30 minutos seguido de lavagem com água destilada estéril (BRASIL, 2009). A desinfestação foi realizada com hipoclorito a 2,5% por 10 minutos seguidos de lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada. Foram semeadas 3 sementes da espécie em cada tubete. Após a emergência das plantulas, foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma planta por tubete. Esta foi escolhida, buscando-se manter a uniformidade de tamanho entre todas as plantas dos tubetes.

As plantas foram cultivadas em tubetes de 355 cm³ contendo areia e vermiculita na proporção de 2:1, previamente esterilizados (Figura 3). As plantas foram irrigadas com solução nutritiva autoclavada conforme Sarruge (1975) em duas condições, uma com nitrogênio e outra com 10x menos nitrogênio conforme a tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Concentração de nutrientes em solução nutritiva utilizada no experimento de autenticação de isolados de rizóbios obtidos de *Alyscarpus vaginalis*.

| Macronutrientes | Com nitrogênio | | Baixa concentração de N | |
|-----------------|------------------------------------|--------|-------------------------|---------|
| | Concentração (mg L ⁻¹) | | | |
| | 50% | 25% | 50% | 25% |
| N | 105 | 52,5 | 10,5 | 5,25 |
| P | 15,5 | 7,75 | 15,5 | 7,75 |
| K | 117 | 58,5 | 117 | 58,5 |
| Ca | 100 | 50 | 100 | 50 |
| Mg | 24 | 12 | 24 | 12 |
| S | 34,95 | 17,475 | 32 | 16 |
| Micronutrientes | | | | |
| B | 0,25 | 0,125 | 0,25 | 0,125 |
| Mn | 0,25 | 0,125 | 0,25 | 0,125 |
| Zn | 0,025 | 0,0125 | 0,025 | 0,0125 |
| Cu | 0,01 | 0,005 | 0,01 | 0,005 |
| Mo | 0,005 | 0,0025 | 0,005 | 0,0025 |
| Fe | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 1,25 |
| Cl | 0,35 | 0,175 | 291,475 | 145,738 |



Figura 3: Vista geral do experimento de autenticação de isolado de nódulos de raízes de *Alyscarpus vaginalis*.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

Foram utilizados como fontes dos nutrientes os seguintes reagentes: KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fe-EDTA, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Micronutrientes (H_3BO_3 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , H_2MoO_4). Da semeadura até 15 dias de emergência, as plantas foram irrigadas com solução em 25% da concentração de nutrientes e, após esta data, até o momento da coleta do experimento foi utilizada a solução a 50% da concentração.

Cada planta foi inoculada com 1,0 mL de inóculo. O preparo do inóculo consistiu no crescimento das estirpes bacterianas em meio YMA líquido sob agitação de 150 rpm, até a fase log de crescimento (HUNGRIA, 1994).

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, constituído de 56 tratamentos, sendo 54 estirpes bacterianas, e dois tratamentos sem inoculação (um com nitrogênio em concentrações adequadas e outro com 10 X menos nitrogênio do que o recomendado).

A coleta do material foi realizada 47 dias após a semeadura, separando-se parte aérea, raiz e nódulos. As diferentes partes da planta foram secadas em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C por 72 horas e

posteriormente pesadas. Foi determinada a eficiência relativa (ER), relação entre rendimento do tratamento inoculado sobre o tratamento com nitrogênio em porcentagem, das estirpes pela equação:

$$ER = \left(\frac{MSPA \text{ tratamento inoculado}}{MSPA \text{ tratamento com N}} \times 100 \right).$$

- ER – Eficiência relativa;
- MSPA tratamento inoculado – massa seca da parte aérea do tratamento inoculado;
- MSPA – massa seca da parte aérea do tratamento sem inoculação e com Nitrogênio.

Os dados de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) e relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO), foram transformados para Log (x) para ajuste de normalidade dos dados. Massa seca de nódulos (MSN) foi transformado em Log (x+2). Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2014).

Identificação molecular dos isolados bacterianos

As bactérias selecionadas através do teste de autenticação, ou seja, os isolados A007, A017, A018, A021, A023, A030, A031, A032, A040, A051 e A054, foram submetidos à identificação molecular utilizando o sequenciamento parcial da região 16S. A seleção foi de acordo com o valor de MSPA e o grupo a que o isolado pertencia.

Para o sequenciamento molecular as colônias bacterianas foram transferidas para microtubos 1,5 mL contendo 200 µL de água autoclavada, segundo protocolo de Ferreira (2008). Essa solução foi usada como fonte de DNA para PCR. Os primers utilizados foram 1378R (5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

As reações foram realizadas contendo 1,0 µL da suspensão bacteriana, 10x de buffer, 0,5 µM de cada deoxirribonucleotídeos trifosfato, 0,2 µL de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase (SIGMA®) diluídos em água Milli-Q autoclavada para um volume total de 50 µL. Um controle negativo (reação de PCR sem material bacteriano) foi incluído em todas as reações. A PCR foi realizada em termociclador (Figura 4) T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62,5 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

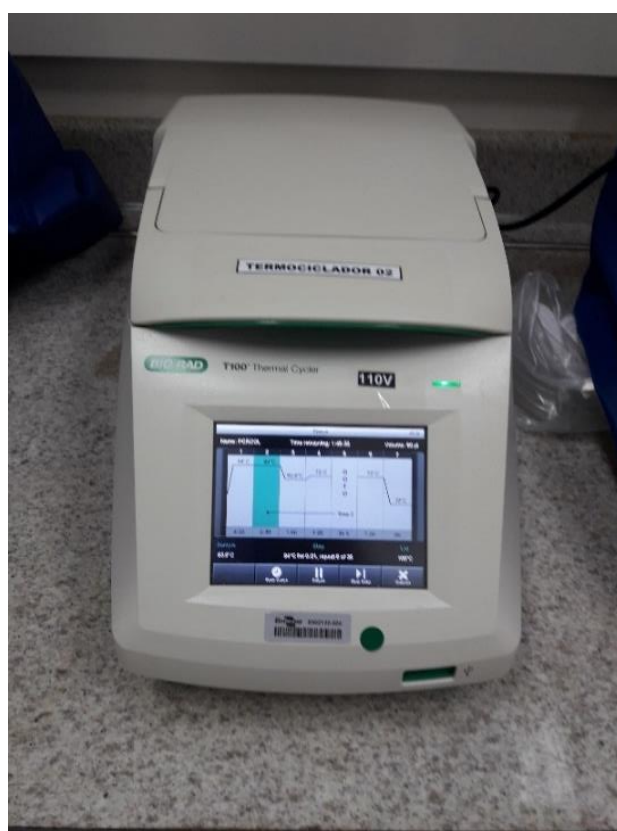


Figura 4: Termociclador T100 Thermal Cycler utilizado na reação em cadeia Polimerase – PCR.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

A confirmação da amplificação do fragmento de DNA alvo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) submetidos à corrida de duração de 1 hora à 60 volts. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta mediante a coloração com GELRED.

Considerou que o material apresentou amplificação quando houve observação de fragmentos de tamanho esperado (1400 pb).

Os produtos de PCR foram purificados com isopropanol gelado à 100% e centrifugação à 9.000 rpm por 15 minutos, após descarte do sobrenadante, 200 µL de álcool à 70% e centrifugação à 9.000 por 5 minutos, seguida de novo descarte de sobrenadante e evaporação em banho seco à 35°C. Após a evaporação as amostras foram ressuspensas em 20µL de água Milli-Q autoclavada e incubadas em geladeira por 24 horas.

Novamente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,0%, com marcador de baixo peso molecular para a quantificação de DNA. Após quantificação da concentração de DNA, as amostras foram diluídas para 50ng/µL e alíquotas de 9,5µL foram enviadas para o Laboratório Myleus Biotecnologia para sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA, conforme protocolo do laboratório. As sequências obtidas foram comparadas por BLASTn contra base de dados do NCBI. Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 750.

Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio

Para este experimento, foram estudados os isolados que apresentarem resultado positivo para formação de nódulos e maior rendimento de massa seca da parte aérea no experimento de autenticação.

O experimento foi realizado em vasos de plástico com capacidade de 1,7 litros de solo coletado na zona rural de Alta Floresta - MT. Foram semeadas 5 sementes previamente desinfestadas conforme descrito anteriormente. O inoculo foi constituído de caldo LM (VINCENT, 1970), com número de células determinado e expresso em mL⁻¹. A adubação foi realizada de acordo com análise química do solo (Tabela 2), seguindo-se a recomendação de Ribeiro et al. (1999) para a cultura da soja.

Tabela 2. Resultado da análise de solo utilizado no experimento de eficiência na fixação biológica de nitrogênio.

| Resultado da análise de solo | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------|-------------------|--------------------|-----|------|------|------------------------------------|----|------|-------|-------|--------|--|
| Amos. | Profun. | pH | P | K | K | Ca | Mg | Al | H+Al | Areia | Silte | Argila | |
| . | . cm | Água | mehlich | | | | | | | | | | |
| | | CaCl ₂ | mg/dm ³ | | | | cmol _d /dm ³ | | | | | g/kg | |
| 1 | 00 - 20 | 5,6 | 9,7 | 222 | 0,57 | 4,71 | 1,13 | 0 | 1,73 | 644 | 99 | 257 | |

| Resultados calculados | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---------|------|------|--------|--------|------------|----|------|---------|-------|------|------|--|
| Amos. | Profun. | CTC | Soma | Satur. | Satur. | Satur. por | | | Relação | | | | |
| . | . cm | pH 7 | de | . por | por | elemento | | | | | | | |
| | | T | Base | base | alúmi | | | | | | | | |
| | | | s | s | nio | K | Ca | Mg | | Ca/Mg | Ca/K | Mg/K | |
| | | | SB | V | m | | % | % | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 00 - 20 | 8,1 | 6,4 | 78,8 | 0,0 | 7,0 | 58 | 13,9 | 4,2 | 8,3 | 2,0 | | |

Análise realizada no Laboratório de Análises de solo, Adubo e Foliar da Universidade do Estado de Mato Grosso - LASAF.

Os tratamentos foram constituídos pelos isolados, além de um tratamento sem adição de nitrogênio e outro com a adição de N, totalizando 27 tratamentos. O delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições. O experimento foi conduzido por 45 dias, no início da fase de florescimento (Figura 5).



Figura 5: Vista geral do teste de eficiência biológica de nitrogênio com isolados de raízes de *Alysicarpus vaginalis*.

Foto: Lucas de Paula Mera (2018).

Na colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, sendo acondicionados em sacos de papel e secados em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. As avaliações realizadas foram: comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO), número de nódulos (N° de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV), teor de nitrogênio (N) e conteúdo de nitrogênio (CONT N) segundo metodologia descrita em Tedesco et al. (1995). Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar 4.6 (FERREIRA, 2014).

A variável RELAÇÃO foi transformada em $1/\log(x)$, N° de nódulos em $\log(x)$ e MSN em $\log(x+2)$, para ajuste de normalidade dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica das colônias

Observou-se, na caracterização cultural dos isolados bacterianos, diferentes tipos morfológicos nas placas, para avaliação da alteração de pH e produção de muco. Foi observada predominância de isolados com capacidade de acidificação do meio de cultura (44%) e isolados que não alteraram o pH do meio (40%), e uma menor frequência de isolados que alcalinizaram o meio de cultura (16%) (Figura 6). As colônias produtoras de muco se sobressaíram em relação às colônias secas. Rizóbios de crescimento rápido, em geral, estão associados com a acidificação do meio, não sendo regra, mas ocorre frequentemente (MARTINS et al., 1997).

A mudança de pH em meio de cultura 79 é, comumente, coeso dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, apresentando a característica de acidificação do meio de cultura. Já *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* possuem a característica de alcalinizar o meio de cultura 79 (COUTINHO et al., 2000).

A caracterização morfológica dos isolados de raízes de *A. vaginalis* avaliados (Figura 6) mostrou que aproximadamente 56% destes apresentaram crescimento lento a intermediário, e aproximadamente 44% crescimento rápido. Estes dados diferem de Elias Neto et al. (2016), que avaliaram a nodulação de *A. vaginalis* em solos do Cerrado Mato-Grossense, verificando predominância de isolados de crescimento rápido e apenas 30% com crescimento lento ou intermediário. As diferenças edafoclimáticas das duas regiões provocaram resultados divergentes entre esta pesquisa e os obtidos por Elias Neto et al. (2016).

As colônias de rizóbios em meio de cultura são diferenciadas pelo tempo de crescimento e que, geralmente há predominância de isolados de crescimento rápido (≥ 3 dias). Estas geralmente são associadas ao gênero *Rhizobium*. Mas as de crescimento intermediário (4 a 5 dias) e as de crescimento lento (6 a 10 dias) são associadas ao gênero *Bradyrhizobium*, que tendem a ser mais eficientes na FBN (EAGLESHAM et al., 1984; MARTINS et al., 1997).

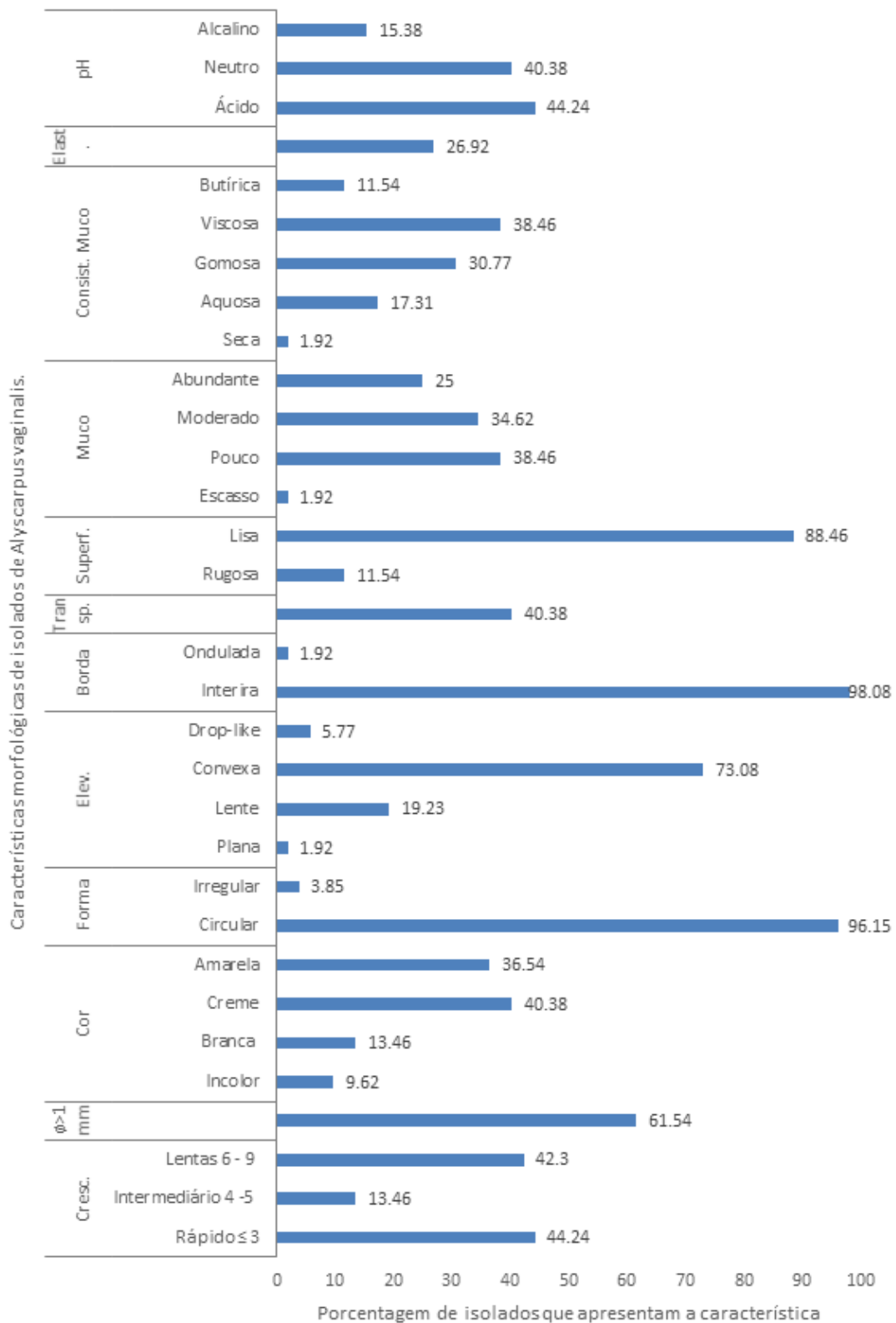


Figura 6. Caracterização morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de *Alyscarpus vaginalis*.

A ocorrência de rizóbios com crescimento lento ou rápido pode estar relacionada com aspectos ligados com a variação de pH dos solos (Stanford et al., 1996). Os autores isolaram rizóbios de soja, feijão caupi e feijão macuco em solos da Zona da Mata e da região semiárida de Pernambuco, constatando que 90% dos isolados da região semiárida apresentaram crescimento rápido enquanto que 100% dos isolados da Zona da Mata mostraram crescimento lento. No geral, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* compreendem um grande número de estirpes de crescimento intermediário a lento que são capazes de nodular inúmeras espécies herbáceas, comuns nas regiões tropicais (JORDAN, 1984). Observamos neste estudo um grande número de bactérias que apresentam esse comportamento de crescimento intermediário a lento.

Foi possível observar que, dos isolados obtidos de raízes de *A. vaginalis*, aproximadamente 62% apresentaram colônias com diâmetro superior a 1,0 mm, Santos et al. (2007) estudando diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais, encontraram dados semelhantes, onde 76% de isolados de amendoim apresentaram colônias com diâmetro superior a 1mm. Os mesmos autores relatam que obtiveram 60% dos isolados de *Stylosanthes* e *Aeschynomene* com colônias superiores a 1,0 mm.

Existe uma forte correlação entre o tamanho da colônia bacteriana e sua habilidade para fixar nitrogênio simbioticamente (ALLEN & ALLEN, 1950). Isolados que tem como características formar colônias grandes e com produção de muito muco são simbioticamente ineficientes, já as colônias pequenas com pouco muco ou secas são mais eficientes na fixação de nitrogênio (HERRIDGE & ROUGHLEY, 1975).

Com relação à coloração, é possível observar que cerca de 40% das colônias apresentaram coloração creme e cerca de 37% coloração amarelada (Figura 6), as demais obtiveram coloração entre branca e incolor. Sampaio (2013) relata resultados similares, trabalhando com isolados silvestres de feijão em solos do município de Nova Veneza - SC. Silva et al. (2014), encontraram valores parecidos, os autores observaram que cerca de 31% dos seus isolados apresentaram a coloração amarela. Também Cassetari (2010), relata ter obtido isolados de coloração amarelo intenso ou coloração variando de creme a branca. Segundo Holt et al. (1994a) o gênero *Bradyrhizobium* apresenta

colônias opacas, eventualmente translúcidas ou brancas. No entanto, a coloração creme, para o gênero, já descrita para estirpes isoladas de *Sitratum* na Amazônia e de *Acácia* no Kenia (LIMA et al., 2005; ODEE et al., 1997)

Quanto à forma, borda, elevação, transparência, superfície da colônia e elasticidade, 96% apresentaram formato circular, 98% borda inteira, 73% convexa, 40% translúcidas, 88% lisas e 27% apresentaram elasticidade (Figura 6). Sampaio (2013) observou dados semelhantes para forma (85% circulares), borda (99% inteira) e transparência (70% opacas), trabalhando com isolados de nódulos de feijoeiro em solos do município de Unaí.

Dos isolados avaliados neste trabalho, apenas o isolado A013 apresentou crescimento rápido, produção de muco escassa e mantiveram o pH neutro, os isolados A020, A021 e A024 apresentaram crescimento rápido, pouca produção de muco e acidificaram o meio de cultura, os isolados A014, A035, A039, A041, A043, A045 e A053 apresentaram crescimento rápido, produção de muco abundante e acidificaram o meio de cultura, e os isolados A003, A005, A008, A010, A011, A012, A016, A044, A046, A047, A048 e A049 apresentaram crescimento rápido, produção de muco moderada e acidificaram o meio de cultura.

O isolado A050 apresentou crescimento intermediário, pouca produção de muco e alcalinizaram o meio de cultura, o isolado A051 apresentou crescimento intermediário, produção moderada de muco e acidificaram o meio de cultura, os isolados A019 e A023 apresentaram crescimento intermediário, produção abundante de muco e mantiveram o pH do meio neutro, e os isolados A027, A032 e A033 apresentaram crescimento intermediário, produziram pouco muco e mantiveram o pH do meio neutro.

O isolado A015 apresentou crescimento lento, produção moderada de muco e mantiveram o pH do meio de cultura neutro, o isolado A036 apresentou crescimento lento, muco abundante e alcalinizaram o meio de cultura, os isolados A040, A052 e A054 apresentaram crescimento lento, muco abundante e mantiveram o pH neutro, os isolados A028, A037, A038 e A042 apresentaram crescimento lento, produção moderada de muco e mantiveram o pH do meio de cultura neutro, os isolados A002, A004, A007, A009 e A029 apresentaram crescimento lento, pouca produção de muco e alcalinizaram o meio de cultura, já os isolados A006, A017, A018, A022, A025, A026, A030 e

A031 apresentaram crescimento lento, produção moderada de muco e mantiveram o pH do meio de cultura neutro.

O crescimento das colônias bacterianas de forma lenta à intermediária, a pouca produção de muco e a alcalinização do meio de cultura são características que remetem aos gêneros *Cupriavidus*, *Azorhizobium* ou *Bradyrhizobium*, já o crescimento rápido, de média a muita produção de muco e a acidificação do meio de cultura remetem aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* ou *Mesorhizobium* (MARCHETTI et al., 2017). Esses resultados são um indicativo de que dos isolados obtidos, 42% podem se enquadrar ao gênero *Rhizobium*, devido à acidificação do pH do meio de cultura, ao crescimento rápido da colônias e à formação de colônias com diâmetros maiores que 1,0 mm.

Esses dados indicam que aproximadamente 54% dos isolados encontrados neste estudo podem apresentar características típicas do gênero *Bradyrhizobium*, pois possuem crescimento intermediário a lento com capacidade de alcalinizar o meio de cultura e colônias que não ultrapassam os 2 mm de diâmetro. O gênero *Bradyrhizobium* apresenta colônias circulares, opacas, podendo ocasionalmente apresentarem translúcidas ou brancas, suas colônias não ultrapassam os 2 mm de diâmetro com 5 a 7 dias de incubação em meio 79, tendem a alcalinizar o meio de cultura ou mantem o pH neutro. (HOLT et al., 1994b; JORDAN, 1984; ARAÚJO, 1994; MELLONI et al., 2006).

Agrupamento dos isolados

De acordo com o dendrograma de similaridade, é possível observar a existência de 4 grupos distintos de bactérias, formados de acordo com as características morfológicas em nível de similaridade de 15% para os isolados de *Alysicarpus vaginalis* (Figura 7).

Dos grupos obtidos, podemos observar (Figura 7) que o grupo I reuniu uma grande quantidade de isolados (22 no total), seguido do grupo II com 11 isolados, grupo IV com 15 e finalmente o grupo III com 04 isolados.

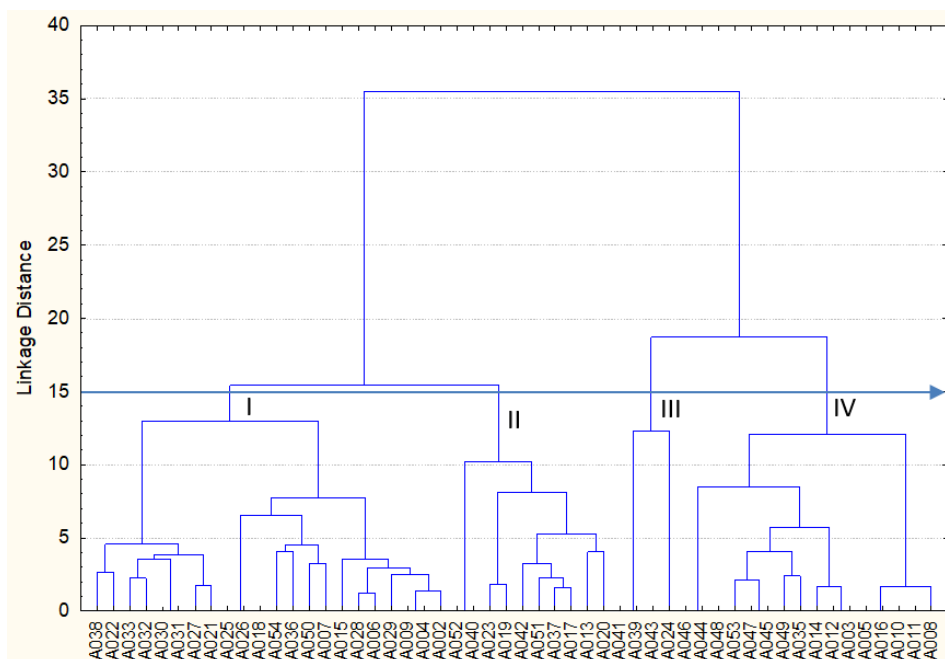


Figura 7. Dendrograma de isolados de rizóbio obtidos de raízes de *Alysicarpus vaginalis*, por caracterização fenotípica e formação de grupos com características semelhantes, coletados no município de Alta Floresta – MT.

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise de componentes principais, com os autovalores e os coeficientes de correlação para verificação de formação dos grupos observados na análise de agrupamento hierárquico. Os resultados indicam que aproximadamente 34% da variabilidade total apresentou correlação pelo primeiro componente principal (CP1). Por sua vez, o segundo componente principal (CP2) explicou aproximadamente 20% da variabilidade, com valor acumulado de aproximadamente 54% da variabilidade contida nos dados originais. O terceiro componente principal (CP3) explicou aproximadamente 15% da variabilidade total dos dados.

Dessa maneira, a somatória dos três componentes principais explicou aproximadamente 69% da variabilidade contida no conjunto original dos dados. A quantidade de variação foi suficiente para a geração de quatro agrupamentos, observados na prévia análise de agrupamentos hierárquicos.

Tabela 3. Autovalores, quantidade de variação explicada, coeficientes de correlação e autovetores entre isolados de rizóbios de plantas de *Alysicarpus vaginalis*.

| Componentes | PC1 | PC2 | PC3 |
|--|------------------|-----------------|------------------|
| Autovalor | 2,750692 | 1,610771 | 1,174775 |
| Acumulativo | 2,750692 | 4,361463 | 5,536238 |
| % Total | 34,38365 | 20,13463 | 14,68469 |
| Acumulativo | 34,38365 | 54,5183 | 69,2030 |
| Coordenadas fatoriais das variáveis, baseadas em correlações (<i>A. vaginalis</i>) | | | |
| Crescimento | -0,809889 | -0,328637 | -0,184016 |
| Cor | 0,692252 | 0,070640 | 0,029988 |
| Elevação | -0,055225 | 0,808137 | 0,251697 |
| Borda | 0,231687 | -0,482198 | 0,789957 |
| Superfície | -0,486926 | 0,669052 | -0,075819 |
| Muco | 0,573885 | -0,216934 | -0,531114 |
| Elasticidade | -0,547880 | -0,011971 | 0,372992 |
| pH | -0,831996 | -0,342554 | -0,160241 |

A correlação das variáveis com os componentes principais indicando a formação dos agrupamentos são apresentados no gráfico biplot (Figura 8). O poder discriminatório das variáveis dentro de um componente principal foi medido pelos coeficientes de correlação lineares entre cada variável e o respectivo componente principal.

Pode-se inferir que para o componente principal CP1 e por ordem de importância, os atributos que apresentaram os maiores coeficientes de correlação foram: pH (-0,83), crescimento (-0,81), cor (0,69), muco (0,57), elasticidade (-0,55), valores aproximados (Tabela 3 e Figura 8), estes componentes são interpretados como sendo as principais características morfológicas que levaram ao agrupamento dos isolados.

De uma maneira geral, os isolados contidos nesse grupo IV apresentam, na sua maioria, coloração amarela, crescimento rápido, muco moderado a abundante e acidificaram o meio de cultura. Esses dados corroboram com o já exposto e evidenciam a possibilidade do grupo ser composto por bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*.

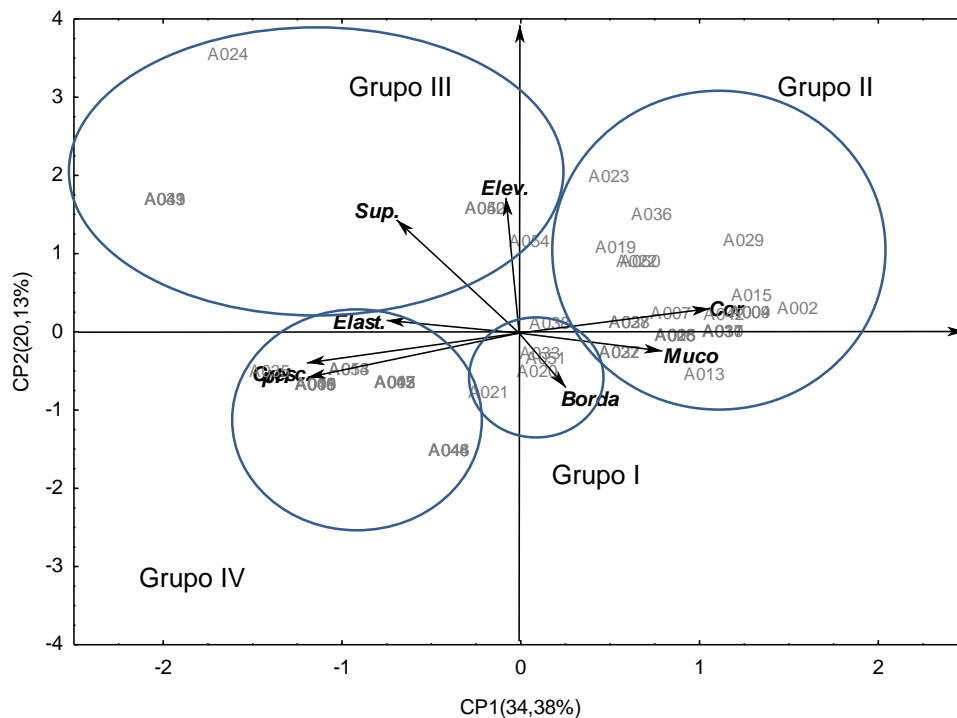


Figura 8. Gráfico biplot dos componentes principais 1 e 2 da análise de componentes principais com as características morfológica referente ao crescimento, diâmetro, coloração, forma, borda, elevação, transparência, superfície, produção de muco, consistência de muco, elasticidade e alteração de pH do meio de cultivo de bactérias isoladas de raízes de *Alyscarpus vaginalis*.

Para o componente principal CP2, os índices que apresentaram maiores coeficientes de correlação foram: elevação (0,81) e superfície (0,67), valores aproximados (Tabela 3 e Figura 8), destes componentes a elevação e a superfície da colônia bacteriana foram os principais para agrupar os isolados, o grupo III, foi composto por isolados que apresentaram a elevação tipo lente, crescimento rápido, coloração amarela, produção abundante de muco e acidificara o meio de cultura.

Para o componente principal CP3, os índices que apresentaram maiores coeficientes de correlação foram: Borda (0,54) e muco (-0,53), valores aproximados (Tabela 3 e Figura 8) estes componentes são interpretados como sendo as principais características morfológicas que levaram ao agrupamento dos isolados, de uma maneira geral, os isolados contidos nesses grupos I e II apresentam crescimento intermediário a lento, coloração creme para branca, a

com pouca produção de muco e tendem a alcalinizar ou manter o pH neutro. Esses dados reforçam a possibilidade das bactérias pertencentes a esses dois grupos serem do gênero *Bradyrhizobium* como já mencionado neste estudo.

Autenticação dos isolados

O tratamento COM N não nodulou, o que era esperado devido ao uso de substrato esterilizado. Dos isolados avaliados, 13 deles não apresentaram capacidade de nodular a *A. vaginalis*, não diferindo significativamente entre eles para a variável MSN (Tabela 4). Esses isolados apresentaram as piores médias para MSPA, MSN, MST e RELAÇÃO, porém se analisarmos a variável MSR observamos que ficaram com letras a e b, ou seja, apresentaram resultados elevados de média. Com esses dados podemos afirmar que a planta obteve um maior desenvolvimento radicular em busca de nutrientes diminuindo o desenvolvimento da parte aérea, como pode ser observado pelas médias obtidas para MSPA, conseqüentemente a relação parte aérea raiz (RELAÇÃO) e a MST também foram afetadas, apresentando as pior médias.

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca total (MST), relação entre parte aérea e raiz (REL), de plantas de *Alysicarpus vaginalis* inoculadas com isolados de rizóbio.

| Isolado | MSPA (mg) | MSR (mg) | MSN (mg) | MST (mg) | RELAÇÃO |
|---------|-----------|----------|----------|----------|---------|
| COM N | 114.23 b | 29.53 a | 0.00 g | 143.76 b | 4.22 b |
| SEM N | 56.83 c | 21.50 a | 0.00 g | 78.33 c | 2.76 c |
| A 002 | 73.73 c | 18.13 b | 4.17 d | 91.86 c | 4.15 b |
| A 003 | 46.83 c | 17.90 b | 0.00 g | 64.73 c | 2.64 c |
| A 004 | 51.27 c | 24.97 a | 3.73 e | 76.24 c | 2.21 d |
| A 005 | 38.53 d | 25.60 a | 0.00 g | 64.13 c | 1.54 d |
| A 006 | 59.00 c | 16.90 b | 7.73 c | 75.90 c | 3.58 b |
| A 007 | 81.80 b | 23.43 a | 6.03 d | 105.23 b | 3.52 b |
| A 008 | 15.67 e | 7.77 b | 0.00 g | 23.44 e | 2.11 d |
| A 009 | 51.57 c | 12.20 b | 2.83 e | 63.77 c | 4.41 a |
| A 010 | 43.43 d | 27.00 a | 0.00 g | 70.43 c | 1.67 d |
| A 011 | 35.40 d | 16.07 b | 0.00 g | 51.47 d | 2.19 c |
| A 012 | 68.60 c | 17.20 b | 4.20 d | 85.80 c | 4.11 b |
| A 013 | 161.17a | 43.13 a | 11.60 b | 204.30 a | 4.02 b |
| A 014 | 42.80 d | 13.70 b | 0.00 g | 56.50 d | 3.77 b |
| A 015 | 95.23 b | 24.50 a | 4.97 d | 119.73 b | 3.94 b |
| A 016 | 50.30 c | 21.70 a | 1.80 f | 72.00 c | 2.32 c |
| A 017 | 110.73 b | 20.97 a | 8.37 c | 131.70 b | 5.44 a |
| A 018 | 147.36a | 30.50 a | 10.87 b | 177.86 a | 4.83 a |

Continuação da Tabela 4.

| | | | | | | | | | | |
|-------|---------|---|-------|---|-------|---|--------|---|-------|---|
| A 019 | 45.03 | d | 16.00 | b | 2.40 | e | 61.03 | c | 2.81 | c |
| A 020 | 63.63 | c | 20.83 | a | 0.00 | g | 84.46 | c | 2.98 | c |
| A 021 | 79.83 | b | 30.37 | a | 0.00 | g | 110.20 | b | 2.65 | c |
| A 022 | 74.27 | c | 18.20 | b | 7.27 | c | 92.49 | c | 4.03 | b |
| A 023 | 135.93a | | 29.53 | a | 4.77 | d | 165.46 | a | 4.71 | a |
| A 024 | 169.93a | | 30.33 | a | 15.17 | a | 200.26 | a | 5.53 | a |
| A 025 | 67.53 | c | 22.50 | a | 6.70 | c | 90.03 | c | 3.01 | c |
| A 026 | 75.63 | c | 16.80 | b | 3.33 | e | 92.43 | c | 4.70 | a |
| A 027 | 136.33a | | 30.00 | a | 10.10 | b | 166.33 | a | 4.68 | a |
| A 028 | 49.60 | c | 14.36 | b | 2.60 | e | 63,96 | c | 3.60 | b |
| A 029 | 140.37a | | 24.17 | a | 12.30 | b | 164.54 | a | 5.92 | a |
| A 030 | 97.67 | b | 36.37 | a | 4.87 | d | 134.04 | b | 2.77 | c |
| A 031 | 121.50a | | 27.47 | a | 4.67 | d | 148.97 | a | 4.71 | a |
| A 032 | 92.53 | b | 17.93 | b | 4.33 | d | 110.46 | b | 5.17 | a |
| A 033 | 59.90 | c | 19.90 | b | 3.73 | e | 79.80 | c | 3.17 | b |
| A 034 | 158.53a | | 41.93 | a | 20.37 | a | 200.46 | a | 4.10 | b |
| A 035 | 73.23 | c | 21.97 | a | 0.47 | g | 95.20 | c | 3.42 | b |
| A 036 | 141.17a | | 40.93 | a | 10.90 | b | 182.10 | a | 3.41 | b |
| A 037 | 144.87a | | 30.77 | a | 4.47 | d | 175.64 | a | 4.81 | a |
| A 038 | 108.70 | b | 28.47 | a | 5.73 | d | 137.17 | b | 3.84 | b |
| A 039 | 59.97 | c | 25.83 | a | 2.63 | e | 85.80 | c | 2.39 | c |
| A 040 | 85.87 | b | 24.26 | a | 3.00 | e | 110.13 | b | 3.54 | b |
| A 041 | 37.27 | d | 10.65 | b | 0.00 | g | 47.92 | d | 3.57 | b |
| A 042 | 129.40a | | 29.67 | a | 6.13 | d | 159.07 | a | 4.76 | a |
| A 043 | 76.60 | b | 21.60 | a | 3.20 | e | 98.20 | c | 3.57 | b |
| A 044 | 80.10 | b | 23.30 | a | 4.37 | d | 103.40 | b | 3.51 | b |
| A 045 | 51.17 | c | 15.60 | b | 0.00 | g | 66.77 | c | 3.29 | b |
| A 046 | 72.15 | c | 17.35 | b | 8.30 | c | 89.50 | c | 4.14 | b |
| A 047 | 84.33 | b | 22.70 | a | 0.00 | g | 107.03 | b | 3.76 | b |
| A 048 | 59.93 | c | 16.27 | b | 6.67 | c | 76.20 | c | 3.85 | b |
| A 049 | 41.23 | d | 26.37 | a | 0.00 | g | 67.60 | c | 1.60 | d |
| A 050 | 40.93 | d | 14.37 | b | 0.00 | g | 55.30 | d | 2.93 | c |
| A 051 | 119.67a | | 31.20 | a | 5.20 | d | 150.87 | a | 3.87 | b |
| A 052 | 50.79 | c | 14.90 | b | 3.67 | e | 65.69 | c | 3.40 | b |
| A 053 | 59.20 | c | 14.20 | b | 3.03 | e | 73.40 | c | 4.21 | b |
| A 054 | 101.07 | b | 29.43 | a | 11.47 | b | 130.50 | b | 3.39 | b |
| A 055 | 133.90a | | 28.47 | a | 6.83 | c | 162.37 | a | 4.80 | a |
| c.v | 5.82 | | 10.15 | | 11.03 | | 5.44 | | 17.37 | |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O isolado A024 foi o que apresentou, de maneira geral, médias elevadas para todas as variáveis analisadas (MSPA, MSR, MSN, MST e RELAÇÃO), superior ao tratamento COM N (Tabela 4). Fernandes & Fernandes (2000) trabalhando com isolados de rizóbios em feijão guandu também obteve um isolado que se destacou, obtendo maiores incrementos de MSPA e MSN superando o tratamento com nitrogênio.

Outros 13 isolados apresentaram médias superiores sem diferirem significativamente entre eles, mas diferindo estatisticamente do tratamento

COM N para o fator MSPA, MSN e MST, porém não apresentaram diferença para MSR. Para esses isolados, podemos afirmar que eles não tiveram influência no desenvolvimento radicular para *A. vaginalis* de acordo com os resultados da Tabela 4. Osorio Filho (2009), estudando o efeito de rizóbios isolados de *Lótus* sp. e utilizados como promotores de crescimento em arroz irrigado, também encontrou isolados capazes de aumentar a MSPA em relação ao tratamento sem inoculação e com uso de nitrogênio, o autor ainda relata que os isolados não diferiram estatisticamente para a variável MSR.

Dos isolados avaliados, quando comparados com o tratamento SEM N, podemos observar que 9 deles apresentaram médias abaixo do tratamento SEM N para MSPA, desta maneira apresentam diferença significativa para o fator analisado, outro dado que pode ser observado é que desses isolados, apenas o A019 teve a capacidade de nodular, porém a MSN foi extremamente baixa, apenas 2,4 miligramas (Tabela 4) e outros 20 isolados não apresentaram diferença significativa para MSPA.

Dos isolados analisados, 75% deles foram capazes de nodular a *A. vaginalis*. Machado et al. (2016) obtiveram valores semelhantes, trabalhando com isolados de *Adesmia latifolia* (babosa do banhado) os autores relatam que 87% dos isolados tiveram a capacidade de nodular. Arruda (2016) relata que dos isolados avaliados provenientes do semiárido pernambucano, cerca de 86% deles apresentaram nodulação, valores semelhantes aos obtidos nesta pesquisa.

A formação de nódulos depende e varia diretamente em função dos genótipos da planta e dos isolados envolvidos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim sendo, como o teste de autenticação foi realizado em casa de vegetação com irrigação e fornecimento de nutrientes controlados, este fato pode ter contribuído para a nodulação dos isolados, a não formação de nódulos por parte de alguns isolados, pode estar relacionada a sua origem (MENNA et al., 2006).

Quando comparamos o tratamento COM N, observamos que 12 isolados (Tabela 4) não diferiram significativamente para a variável MSPA, destes isolados, apenas o M032 apresentou diferença significativa para MSR em relação aos demais.

Para a variável MSN os isolados, A003, A005, A008, A010, A011, A014, A020, A021, A035, A041, A045, A047, A019 e A050 não apresentaram diferença estatística quando comparados COM N e SEM N, outros 40 isolados apresentaram diferença estatística quando comparados com os tratamentos COM N e SEM N. Os isolados A024 e A034 apresentaram as maiores médias. Arruda (2016) observou valores diferentes ao deste estudo para a variável MSN, a autora relata que dos isolados avaliados provenientes do semiárido pernambucano, não houve diferença significativa para nenhum dos isolados avaliados.

Vários hormônios de crescimento estão envolvidos diretamente na ação das rizobactérias, já que em vários trabalhos não foi observada uma redução de efeito de crescimento de plantas, quando estas foram desenvolvidas em solos autoclavado ou quando foram cultivadas sob condições gnotobióticas (SUSLOW & SCHROTH, 1982).

A eficiência relativa é um indicativo da contribuição, em termos percentuais, da fixação de nitrogênio nos tratamentos inoculados com base no rendimento da massa seca da parte aérea das plantas que receberam tratamento controle, COM N e SEM N.

Quando comparamos o tratamento com nitrogênio e sem inoculação (Figura 9), podemos observar que 13 isolados (A013, A018, A023, A024, A027, A029, A031, A035, A036, A037, A042, A051 e A055) obtiveram eficiência relativa (ER) maior que a do tratamento COM N, este dado pode ser um indicativo de que os isolados foram capazes de fornecer teores de N suficientes para a planta se desenvolver mais do que o tratamento COM N.

O isolado A024 apresentou a melhor ER, chegando a aproximadamente 149% de eficiência, valor bem superior ao relatado por Alves (2005) trabalhando com trevo branco, o autor relata que a maior ER encontrada foi de 89%. Fontoura (2007) obteve dados semelhantes, o autor relata ER na ordem de 133% trabalhando com duas plantas do gênero *Lotus*. Já Frizzo (2007) obteve dados diferentes com a leguminosa *Lotus*, observou valores para ER na ordem de 45%, valores inferiores aos obtidos nesta pesquisa.

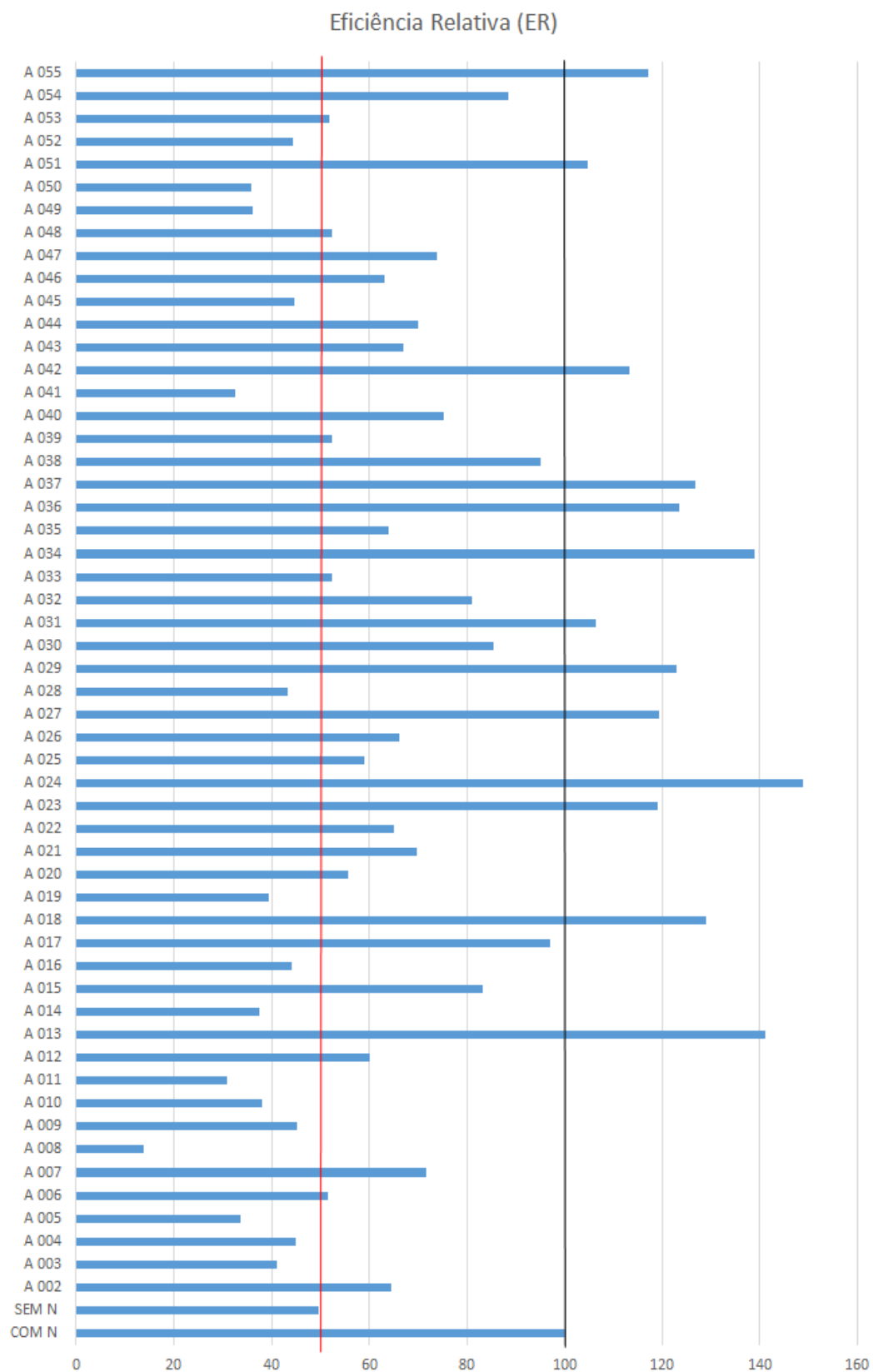


Figura 9. Eficiência relativa (ER) da produção de massa seca da parte aérea apresentada por plantas de *Alyscarpus vaginalis* inoculadas com isolados de rizóbio obtidos de raízes de *Alyscarpus vaginalis* em solos da região periurbana e rural do município de Alta Floresta – MT.

Dos isolados observados (Figura 9), 16 apresentaram ER menor que o tratamento SEM N e 25 isolados apresentaram ER maior que o tratamento SEM N, porém, apresentando ER menor quando comparado com o tratamento COM N. Nos rizóbios a síntese de auxinas e a alteração da relação entre auxinas e citocininas está relacionada diretamente com a capacidade de iniciação da formação de nódulos na planta, desta maneira, os mecanismos genéticos de regulação da biossíntese de auxina por bactérias como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, são correlacionados com funções que influenciam a fisiologia e o desenvolvimento da planta hospedeira (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995).

Os isolados que apresentaram os melhores desempenhos no teste de autenticação foram selecionados para o experimento de eficiência de fixação biológica de nitrogênio, sendo assim isolados todos aqueles que apresentaram médias semelhantes ou superiores ao tratamento com nitrogênio, segundo o teste de Scott-Knott.

Sequenciamento dos isolados de *Alysicarpus vaginalis*

Dos isolados selecionados para identificação genética pelo sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA, não foi possível realizar a identificação de quatro deles (A015, A037, A042 e A055), as amostras não apresentaram semelhança significativa, possivelmente a quantidade de par de bases contida na amostra não foi suficiente para a identificação dos isolados.

Os isolados de nódulos de raízes de *A. vaginalis*, denominados A007 e A032, apresentaram como características o crescimento intermediário e lento respectivamente, coloração creme, pouca produção de muco e mantiveram o pH neutro e alcalino respectivamente, conforme indicado na caracterização morfológica. A análise da sequência do gene 16S rDNA dos isolados citados indicou similaridade de 99%, para ambos isolados, com o gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 5). Esses resultados corroboram com o que foi observado na análise morfológica e agrupamento dos isolados.

A bactéria isolada e identificada com *Bradyrhizobium japonicum* é amplamente utilizada na agricultura. Taiz & Zeiger (2004) afirmam que as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, quando inoculadas em sementes de

leguminosas, podem fornecer praticamente todo o nitrogênio que a planta necessita, vale ressaltar que a eficiência do processo depende da especificidade da espécie leguminosa e da estirpe utilizada. A FBN promovida por *Bradyrhizobium* substitui a adubação nitrogenada, elevando a produtividade de soja (HUNGRIA et al., 2005).

Tabela 5. Identificação genética por sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA de isolados de nódulos de raízes de *Alysicarpus vaginalis*.

| Isolado | Identificação dos isolados | Total Score | % de ident. | Nº de Acesso |
|---------|----------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| A007 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 1323 | 99% | NR_119191.1 |
| A017 | <i>Bacillus tropicus</i> | 841 | 88% | NR_157736.1 |
| A018 | <i>Bradyrhizobium vignae</i> | 1282 | 98% | NR_147716.1 |
| A021 | <i>Paenibacillus catalpae</i> | 1362 | 99% | NR_118012.1 |
| A023 | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 126 | 73% | NR_036953.1 |
| A030 | <i>Bradyrhizobium vignae</i> | 327 | 75% | NR_147716.1 |
| A031 | <i>Bradyrhizobium vignae</i> | 1347 | 99% | NR_147716.1 |
| A032 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 1360 | 99% | NR_119191.1 |
| A040 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 1328 | 99% | NR_159233.1 |
| A043 | <i>Rhizobium jaguaris</i> | 839 | 89% | NR_109700.1 |
| A051 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 1373 | 99% | NR_159233.1 |
| A054 | <i>Bradyrhizobium namibiense</i> | 785 | 88% | NR_159233.1 |

Os isolados A018, A030 e A031, apresentaram como característica morfológica, crescimento lento, coloração da colônia branca a creme, produção de pouco muco e mantiveram o pH neutro. A análise da sequência do gene 16S rDNA dos isolados citados, indicou similaridade com o gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 5), com similaridade de sequência entre pares e tipo de linhagem de gênero relacionados de 98% e 99% para os isolados A18 e A31 respectivamente, esses resultados corroboram com o que foi observado na análise morfológica e agrupamento dos isolados.

O isolado A030 apresentou similaridade de 75% com o *Bradyrhizobium vignae*. Vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduo ainda não identificado, sendo indicado estudos complementares. Grönemeyer et al., (2016) obteve isolados de *Bradyrhizobium vignae* oriundos de feijão caupi, amendoim bambara e amendoim.

O isolado A017, apresentando crescimento lento, coloração de colônia branca, produzindo pouco muco e mantendo o pH do meio neutro. O isolado apresentou na análise de sequenciamento do gene 16S rDNA como sendo do gênero *Bacillus* (Tabela 5), com similaridade de sequência entre pares e tipo de linhagem de gênero de 88%. Vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduo ainda não identificado, sendo indicado estudos complementares.

O isolado A021, apresentou como característica morfológica, crescimento rápido, coloração da colônia creme, produção de pouco muco e acidificou o pH do meio de cultura. A análise da sequência do gene 16S rDNA do isolado apresentou similaridade com o gênero *Paenibacillus* (Tabela 5), com similaridade de sequência entre pares e tipo de linhagem de gênero relacionados de 99%. Este isolado não apresentou nodulação no experimento de autenticação porém houve eficiência no acúmulo de MSPA sendo um indicativo que o isolado possa atuar como promotor de crescimento; já o isolado A017, apresentou uma baixa nodulação. Geralmente os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* são endofíticos, porém não nodulíferos, embora ocorram relatos de bactérias dos gêneros nodulando feijão-caupi (JARAMILLO et al., 2013; MARRA et al., 2012), esses corroboram com os dados dessa pesquisa. Diversos autores sugerem que as bactérias endofíticas de nódulos podem evoluir para bactérias com capacidade de simbiose, devido a transferência horizontal de genes simbióticos (SHIRAISHI et al., 2010; LI et al., 2008).

O fato do isolado A017 apresentar nodulação pode ser explicado pois alguns trabalhos relatam a nodulação de siratro e feijão caupi por alguns representantes do gênero *Bacillus*, juntamente com representantes do gênero *Paenibacillus* (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013; SILVA et al., 2007; GARDENER, 2004; MARRA et al., 2012).

O isolado A023 apresentou como característica morfológica, crescimento intermediário, colônia incolor, produção abundante de muco e manteve o pH do meio de cultura neutro. A análise da sequência do gene 16S

rDNA colocou-o no gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 5), com similaridade de 73%. Zalli et al. (2006) também identificaram isolados de *Bradyrhizobium* trabalhando com feijão caupi. Porém vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduo ainda não identificado, sendo indicado estudos complementares.

Os isolados A040, A051 e A054, apresentaram como característica morfológica, crescimento intermediário a lento, coloração da colônia creme, produção moderada de muco e mantiveram o pH neutro. A análise da sequência do gene 16S rDNA dos isolados mostrou similaridade com o gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 5), com similaridade de 99% para os isolados A040 e A051, já o isolado A051 apresentou similaridade de 88%. Porém vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010).

Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduo ainda não identificado, sendo indicado estudos complementares. Esses resultados corroboram com o que foi observado na análise morfológica e agrupamento dos isolados. Grönemeyer et al. (2017) estudando bactérias fixadoras de nitrogênio de nódulos radiculares de feijão de cheiro, na Namíbia, isolou 4 estirpes, sendo uma delas proposta como nova espécie a *Bradyrhizobium namibiense*, mesma espécie encontrada neste estudo.

O isolado A043, apresentou como característica morfológica, crescimento rápido, colônia amarela, produção moderada de muco e alterou o pH do meio de cultura para ácido. A análise da sequência do gene 16S rDNA do isolado apresentou similaridade com o gênero *Rhizobium* (Tabela 5), com similaridade de 89%. Rincón-Rosales et al. (2013) em seu estudo com rizóbios, propuseram três novas espécies, o *Rhizobium calliandrae* sp. nov., o *Rhizobium mayense* sp. nov. e o *Rhizobium jaguaris* sp. nov.. Porém vale ressaltar que a nota de corte sugerida na literatura para identificação de gênero é de aproximadamente 95% de similaridade, baseando-se no gene 16S rRNA

(STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; TINDALL et al, 2010). Desta maneira, é possível afirmar que a estirpe isolada pode corresponder a indivíduo ainda não identificado, sendo indicado estudos complementares.

São muitos os trabalhos que têm identificado estirpes de rizóbios como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, isolados de nódulos de feijão-caupi (JARAMILLO et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012), assim como os encontrados no presente trabalho, porém durante a revisão de literatura não foi encontrado trabalhos com isolamento e identificação por gene parcial 16S rDNA com *Alysicarpus vaginalis*.

Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio

Para as variáveis analisadas, no teste de eficiência Biológica de nitrogênio, apenas o fator RELAÇÃO foi significativo, de acordo com o teste f (Tabela 6).

Tabela 6. Tabela de análise de variância para os fatores comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), relação parte aérea e raiz (RELAÇÃO) de plantas de *Alysicarpus vaginalis* inoculadas com diferentes isolados.

| FV | GL | QM | | | | | | | |
|----------|----|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|--|
| | | CR | VR | MSR | CPA | MSPA | MST | RELAÇÃO | |
| Isolados | 26 | 32,14947 _{ns} | 0,00215 _{ns} | 0,00008 _{ns} | 79,27376 _{ns} | 0,00423 _{ns} | 0,00473 _{ns} | 0,02063* | |
| Resíduo | 81 | 28,31582 | 0,00224 | 0,00007 | 64,98252 | 0,00359 | 0,00405 | 0,01875 | |
| c.v.% | | 14,72 | 10,48 | 2,68 | 20,96 | 12,97 | 13,35 | 12,89 | |

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste f.

ns não significativo a 5% de probabilidade pelo teste f.

Podemos observar que os isolados avaliados não apresentaram diferença significativa para comprimento de raiz (CR), volume de raiz (VR), massa seca de raiz (MSR), comprimento de parte aérea (CPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), assim sendo, os isolados não foram capazes de influenciar nos atributos de crescimento da parte aérea e de raiz.

Já para a variável relação entre parte aérea e raiz os isolados A030 e A043 diferiram do isolado A027, os outros isolados não apresentaram diferença quando comparados com os tratamentos COM e SEM N (Tabela 7).

Assim sendo, as plantas inoculadas com os isolados A030 e A043 demonstraram maior desenvolvimento foliar em relação a raiz, evidenciando que na zona de exploração do sistema radicular havia quantidades de nutrientes suficientes para que a planta não necessitasse investir em crescimento radicular em busca de nutrientes minerais e/ou que as quantidades de nitrogênio fornecidas pelos isolados possam ter influenciado no desenvolvimento da parte aérea da planta, já que se tratam de um *Bradyrhizobium vignae* e um *Rhizobium jaguaris* respectivamente conforme Tabela 5.

Tabela 7. Relação entre parte aérea e raiz (RELAÇÃO), de plantas de *Alysicarpus vaginalis* inoculadas com isolados de rizóbio

| ISOLADO | RELAÇÃO | |
|----------|---------|----|
| A007 | 8,35 | ab |
| A013 | 9,77 | ab |
| A015 | 9,91 | ab |
| A017 | 9,67 | ab |
| A018 | 8,74 | ab |
| A021 | 8,38 | ab |
| A023 | 8,95 | ab |
| A024 | 9,15 | ab |
| A027 | 7,19 | b |
| A029 | 9,27 | ab |
| A030 | 10,47 | a |
| A031 | 9,49 | ab |
| A032 | 8,42 | ab |
| A034 | 8,21 | ab |
| A036 | 9,51 | ab |
| A037 | 9,71 | ab |
| A038 | 9,26 | ab |
| A040 | 9,23 | ab |
| A042 | 9,61 | ab |
| A043 | 10,34 | a |
| A044 | 9,48 | ab |
| A047 | 9,04 | ab |
| A051 | 8,04 | ab |
| A054 | 8,37 | ab |
| A055 | 9,70 | ab |
| COM N | 8,09 | ab |
| SEM N | 8,47 | ab |
| C.V. (%) | 12,89 | |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa na MSN (Tabela 6 e Tabela 8). Fernandes et al. (2003), encontraram dados diferentes, os autores relatam ter encontrado diferença significativa para variáveis MSPA e MSN trabalhando com rizóbios em diferentes culturas. A síntese de fitohormônios, nas bactérias do grupo rizóbio, está relacionada diretamente com a capacidade de iniciação da formação de nódulos na planta, esses fitohormônios são reguladores naturais de crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos e no desenvolvimento da planta hospedeira (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995; PEIXOTO et al., 2002).

Tabela 8. Tabela de análise de variância para os fatores número de nódulos (Nº de nódulos), massa seca de nódulos (MSN), índice verde (IV), teor de nitrogênio (N) e conteúdo de nitrogênio (CONT N), de plantas de *Alysicarpus vaginalis* inoculadas com diferentes isolados.

| FV | GL | QM | | | | |
|----------|----|---------------|------------|------------|-------------|------------|
| | | Nº de nódulos | MSN | IV | N | CONT N |
| Isolados | 26 | 0,059830* | 0,000189ns | 2,035537ns | 41,780364** | 0,031824ns |
| Resíduo | 81 | 0,035488 | 0,000215 | 2,630249 | 27,682379 | 0,038096 |
| c.v.% | | 8,97 | 4,72 | 4,69 | 14,86 | 13,06 |

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste f.

** significativo a 10% de probabilidade pelo teste f.

Os atributos massa seca de nódulos, índice verde, e conteúdo de nitrogênio no tratamento não apresentaram diferença significativa entre os isolados (Tabela 8). Esses dados são um indicativo que nenhum dos isolados avaliados foi capaz de fornecer quantidades de nitrogênio que influenciassessem nos teores de clorofila medidos pelo índice SPAD, bem como no conteúdo de nitrogênio apresentado pelas plantas avaliadas.

Para número de nódulos, apenas os isolados A018 e A027 apresentaram diferença quando comparado com o tratamento SEM N (Tabela 9). Devido ao padrão de nodulação que foi observado nos 25 isolados testados, podemos avaliar que é de fundamental importância a etapa de seleção de rizóbios em ambientes axênicos, pois a diferenciação da capacidade de nodulação destes isolados nativos, em campo, pode ser mascarada, vale ainda ressaltar que ocorre nodulação induzida pelo solo, devido à presença de bactérias nativas presente no solo.

Tabela 9. Número de nódulos (Nº Nódulos) e teor de nitrogênio na análise foliar (N) de plantas de *Alysicarpus vaginalis* inoculadas com isolados de rizóbio, os valores para N estão expressos gramas por quilo.

| ISOLADO | Nº Nódulos | N |
|---------|------------|----------|
| A007 | 130,12 ab | 36,77 ab |
| A013 | 167,62 ab | 36,70 ab |
| A015 | 165,12 ab | 39,95 ab |
| A017 | 149,62 ab | 32,87 ab |
| A018 | 222,37 a | 30,12 ab |
| A021 | 92,75 ab | 36,75 ab |
| A023 | 138,12 ab | 34,67 ab |
| A024 | 123,87 ab | 40,47 ab |
| A027 | 197,37 a | 35,80 ab |
| A029 | 148,12 ab | 34,10 ab |
| A030 | 162,87 ab | 32,72 ab |
| A031 | 160,75 ab | 31,67 ab |
| A032 | 136,62 ab | 35,00 ab |
| A034 | 121,62 ab | 33,47 ab |
| A036 | 100,50 ab | 35,52 ab |
| A037 | 138,37 ab | 36,35 ab |
| A038 | 155,12 ab | 36,35 ab |
| A040 | 126,75 ab | 32,75 ab |
| A042 | 129,12 ab | 38,37 ab |
| A043 | 136,62 ab | 37,00 ab |
| A044 | 146,25 ab | 31,75 ab |
| A047 | 137,50 ab | 31,90 ab |
| A051 | 100,62 ab | 43,10 a |
| A054 | 122,12 ab | 38,85 ab |
| A055 | 161,62 ab | 26,62 b |
| COM N | 70,00 ab | 38,05 ab |
| SEM N | 94,62 b | 34,97 ab |
| C.V. | 8,97 | 14,86 |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de probabilidade. Para N médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade.

Nem sempre o alto número de nódulos está associado à alta produção (CHEN et al., 2003). É possível observar esse efeito nesta pesquisa, pois observamos que houve diferença significativa no número de nódulos porém não foi observado diferença para a variável MSPA.

Quando observamos o teor de nitrogênio obtido pela análise foliar, apenas o isolado A051, *Bradyrhizobium namibiense*, diferiu significativamente em relação ao isolado A055 (Tabela 9), desta maneira é possível afirmar que o

isolado foi capaz de fornecer um bom teor de N para a parte aérea da planta, cerca de 43 g.kg⁻¹, valor esse que fica entre a faixa ótima para a cultura da soja, 36,0 a 47,8 g.kg⁻¹ (URANO et al., 2007).

Os isolados testados não apresentaram diferença significativa com o tratamento COM N, este fato indica que a adubação nitrogenada, neste caso, não se faz necessária, por outro lado, a não diferenciação do tratamento SEM N indica que o solo pode ter suprido a necessidade nutricional de N da planta ou que a população nativa de rizóbios possam que contribuído com o desenvolvimento dessas plantas.

Ao analisar o conteúdo de nitrogênio no tratamento, verifica-se que não houve diferença entre os isolados avaliados. A utilização deste parâmetro para avaliação da fixação de nitrogênio é adequada pois há efeito do peso de MSPA em relação ao teor de N, o que não foi verificado neste estudo.

Dos resultados obtidos neste estudo, podemos observar que três dos isolados que apresentaram diferença significativa em algumas das variáveis analisadas para o teste de eficiência (A018, A027 e A051), também apresentaram Eficiência relativa maior que o tratamento COM N no teste de autenticação dos isolados, comprovando o potencial para novos estudos.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a partir do estudo de isolados de rizóbios de raízes de *Alysicarpus vaginalis* coletados da zona periurbana e rural do município de Alta Floresta - MT conclui-se que:

Os isolados de nódulos de *Alysicarpus vaginalis* apresentaram alta diversidade fenotípica e genética.

As bactérias de crescimento intermediário e lento com produção de pouco muco são mais eficientes na fixação de nitrogênio.

Foram identificadas, através de análise de sequenciamento do gene 16S rDNA, as seguintes bactérias: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus* e *Paenibacillus catalpae*.

Dentre as estirpes não nodulíferas promotoras de crescimento de *Alysicarpus vaginalis*, estão os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*.

As estirpes A018, A027 e A051 possuem potencial para novos estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E. K.; ALLEN, O. N. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. **Botanical Review**, v.14, p.273-330, 1950.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.
- ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 78f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pelotas. 2005.
- ARAÚJO, S.R. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S.R. (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. cap.7, p.157-170.
- ARRUDA, A. M. de. **Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação biológica de nitrogênio com estirpes isoladas de solos do semiárido de Pernambuco**. 64f. 2016. Dissertação (Mestrado em Melhoramento genético de plantas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2016.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. 2009. 399p.
- BODDEY, R.M.; SÁ, J.C.D.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p.787-799, 1997.
- CASSETARI, A. S. **Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica**. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências com área de concentração em solos e nutrição de plantas). ESALQ/USP. Piracicaba. 2010.
- CHEN, Q.; ZHANG, X.; TEREFWORK, Z.; KAIJALAINEN, S.; LI, D.; LINDSTRÖM, K. Diversity and comparibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. **Plant and Soil**, v.255, p.605-617, 2003.
- COSTA, E. M.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1275-1284, 2013.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytormones by pnat-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, n.1, p.1-18, 1995.
- COUTINHO, H. L.C.; OLIVEIRA, V. M.; MOREIRA, F. M. S. Systematics of legun nodule nitrogen fixing: agronomic and ecological applications. In PRIEST,

F. G.; GOODFELLOW, M. **Applied Microbial Systematic**. Dordrecht: Kluwer, p 107-134, 2000.

COOK, B.G.; PENGELLY, B.C.; BROWN, S.D.; DONNELLY, J.L.; EAGLES, D.A.; FRANCO, M.A.; HANSON, J.; MULLEN B.F.; PARTRIDGE, I.J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. **Tropical Forages: an interactive selection tool**. Brisbane, Austrália. 2005. Disponível em: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/33575>> Acessado em: 18 des. 2018.

DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; PAULA, A. M.; MACEDA, A.; MATTANA, A. L. **Guia prático de biologia do solo**. Curitiba. SBCS/NEPAR. 60-70p. 2016.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 38p.1999.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A.; GOLDMAN, B.J. Patterns of diversity of cowpea-miscellany rhizobia from three West African locations. In: GHAI, B.S. **Symbiotic nitrogen fixation**. Ludhiana: USG, v.1, p.119-125.1984.

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York, John Wiley, 1993. 170p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista brasileira de Ciências do solo**, v. 24, n.1, 321-327. 2000.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão de porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842, 2003.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucaliptus***. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p.109-112. 2014.

FONTOUTA, R. A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pelotas. 2007.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw – Hill Book, 145p. 1928.

FRIZZO, M. L. dos. S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus***

Schkuhr. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pelotas. 2007.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v.94, p.1252-1258, 2004.

GRÖNEMEYER, J. L.; HUREK, T.; BÜNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., um simbiote fixador de nitrogênio isolado de nódulos efetivos de *Vigna* e *Arachis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n.1, p.62-69, 2016.

GRÖNEMEYER, J. L.; BÜNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.67, p.4884-4891, 2017.

GUIMARÃES, S. C.; BELUFI, L. M. R.; SILVA, J. L. Germinabilidade de sementes de *Alysicarpus Vaginalis* em função da temperatura e do armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: Centro de Convenções, v.27, p. 1139-1143, 2010.

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

HER, G.R.; GLAZEBROOK, J.; WALKER, G.C.; REINHOLD, V.N. Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium melioli* Strain Rm1021. **Carbohydrate Research**, v.198, p.305-312, 1989.

HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R. J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.38, p.19-27, 1975.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994a. p.78 - 94.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. Enrichment and isolation. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A., KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. 1994b. p. 714.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M. ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa. p.45-59. 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja. 2001. 48 pg. circular técnica n.35 Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/memoriatecnica/circtec/circTec35.pdf>> Acessado em: 02 jul. 2017.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Dordrecht: Springer, p. 25 - 42. 2005.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **Base de dados**. Disponível em: <<http://inmet.gov.br/portal/>> Acesso em: 09 nov. 2018.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP. 608p. 2000.

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

JORDAN, D. C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HORT, J. G. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians Wilkins. p. 235 - 244. 1984.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, p.1547-1549, 2018.

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

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1095-1104, 2005.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S. de.; COSTA, M. D.; DALL'AGNOL, G.; OLDRA, S.; SILVA, V. Isolamento, autenticação e seleção de rizóbios de *Adesmia*. **Tecno-Lógica**, v.20, n.1, p.14-19, 2016.

MARCHETTI, M. M.; SANTOS, J. C. P.; BARATTO, C. M. Caracterização de bactérias em nódulos de leguminosas arbóreas de fragmentos da floresta ombrófila mista. **Revista Scientia Agraria**, v.18, n.4, p.50-62, 2017.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M. de; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J. M. de; MOREIRA, F. M. de

S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.

MARTINS, L. M. V.; NEVES M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.

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

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

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2006, 726 p.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

NATIONAL PLANT DATA CENTER, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA, USA. 2000. Disponível em: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26456> Acessado em: 18 dez. 2018.

ELIAS NETO, N.; OLIVEIRA, M. A. R. de.; CENI, I. de.; ZUCHER, F. Avaliação da nodulação radicular em *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC Leguminosa invasora e exótica presente no Cerrado Mato-Grossense. **Ciência & Tecnologia**, v.8, n. Especial, p. 1-5, 2016.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, v.188, n.1, p.65-75, 1997.

OSORIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado**. 97f. 2009. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p.62-76, 2002.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, R. dos S. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 6, p. 153-174.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVEZ, V. H. V. **5ª Aproximação – recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 360p. 1999.
- RINCÓN-ROSALES, R.; VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M.; ROGEL, M. A.; MARTINEZ, J.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3423-3429, 2013.
- SAMPAIO, F. B. **Isolados de rizóbio capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2013.
- SANTOS, C. E. de. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C.P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269 - 274, 2010.
- SILVA, V.N.; SILVA, L. E. S. F.; MARTINEZ, C. R.; SELDIN, L.; BURITY, H. Á.; FIGUEIREDO, M. V. B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.29, p.331-338, 2007.
- SILVA, L. L.; PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Diversidade de rizóbios da unidade de conservação de Ubajara no Estado do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p.2146, 2014.
- SILVEIRA, A. P. D. da.; FREITAS, S. dos. S. **Microbiologia e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo. p.312. 2007.

- SULOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Role of deleterious rhizosphere as minor pathogens in reducing crop growth. **Phytopathology**, v.72, p.111-115, 1982.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.846-849, 1994.
- STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no jacutupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira do Solo**, v.20, n.1, p.49-54, 1996.
- STATSOFT, INC. **Statistica data analysis software system, version 10**. 2011. Disponível em: <<https://www.statsoft.com>> acessado em: 12 dez. 2018.
- TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6° ed., Porto Alegre: Artemed, p.719. 2016.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X Windows interdice: flexuble startegies for multiple sequence alignment ideal by quality tool. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4884, 1997.
- TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.249-266, 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 10 ed. Artmed: Porto Alegre. 167-170p. 2012.
- URANO, E. O. M.; KURIHARA, C. H.; MAEDA, S.; VITORINO, A. C. T.; GOLÇALVES, M. C.; MARCHETTI, M. E. Determinação de teores ótimos de nutrientes em soja pelos métodos chance matemática, sistema integrado de diagnose e recomendação e diagnose da composição nutricional. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.63-72, 2007.
- VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; PERES, J. R. R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos do cerrado**. Embrapa Cerrados. Brasília. 15-20 p. 1994.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- WALLEY, F.L.; STEPHENS J.H. RHIZOBIA in: Dekker, M. **Encyclopedia of Pest**, 1ª ed, CRC Press, p. 718-726. 2002.
- ZALLI, E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FILHO, F. R. F.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de

bradyrhizobium isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.5, p.811-818, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos a partir do estudo de isolados de rizóbios de raízes de *Macroptilium lathyroides* e *Alysicarpus vaginalis* coletados da zona periurbana e rural do município de Alta Floresta - MT conclui-se que:

Os isolados apresentam grande heterogeneidade.

Há predominância de isolados de *Macroptilium lathyroides* de crescimento rápido, no entanto somente um isolado de crescimento rápido apresenta eficiência na fixação de nitrogênio.

Os isolados de *Alysicarpus vaginalis* que apresentaram crescimento intermediário e lento com produção de pouco muco são mais eficientes na fixação de nitrogênio, comparando com os outros isolados deste estudo.

Foram identificadas, através de análise da sequenciamento do gene 16S rDNA, as seguintes bactérias, para *Alysicarpus vaginalis*: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium vignae*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium namibiense*, *Rhizobium jaguaris*, *Bacillus tropicus* e *Paenibacillus catalpae*.

Foram identificadas, através de análise da sequenciamento do gene 16S rDNA, as seguintes bactérias para *Macroptilium lathyroides*: *Mucilaginibacter gossypicola*, *Novosphingobium arabidopsis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus xiamenensis*, *Bradyrhizobium namibiense* e *Flavobacterium anhuiense*.

Os isolados M004, M005 e M022 apresentaram valores de teor de nitrogênio muito próximos ao do tratamento COM N, sendo indicados para novos estudos com culturas de importância comercial.

Os isolados A018, A027 e A051 possuem potencial para novos estudos com culturas de importância econômica.

A estirpe A51 apresentou teor de nitrogênio mais elevado do que o tratamento COM N.