



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE NÓDULOS DE JUREMA PRETA (*Mimosa
tenuiflora*) CULTIVADA EM SOLOS DE ÁREAS DE CAATINGA**

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO

**AREIA – PB
FEVEREIRO-2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE NÓDULOS DE JUREMA PRETA (*Mimosa
tenuiflora*) CULTIVADA EM SOLOS DE ÁREAS DE CAATINGA**

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO

Mestre em Zootecnia

**AREIA-PB
FEVEREIRO -2016**

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE NÓDULOS DE JUREMA PRETA (*Mimosa
tenuiflora*) CULTIVADA EM SOLOS DE ÁREAS DE CAATINGA**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Comitê de Orientação:

Prof. D. Sc. Alberício Pereira de Andrade

Prof. D. Sc. Mailson Monteiro do Rêgo

Prof. D. Sc. Divan Soares da Silva

AREIA-PB

FEVEREIRO -2016

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.*

P331c Paulo, Paula Frassinetti Medeiros.

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de nódulos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) cultivada em solos de áreas de Caatinga / Paula Frassinetti Medeiros Paulo. - Areia: UFPB/CCA, 2016.

xvii, 116 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Semiárido. 3. Salinidade. 4. Enzimas de restrição. I. Andrade, Alberício Pereira de (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 631.461.5(043.2)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO – Filha de Francisco Paulo Neto e Nancy Medeiros dos Santos Paulo nasceu na cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte. Graduiu-se em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no período de 2003 a 2009. Em 2012 obteve-se o título de Mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Zootecnia - Nível Mestrado na Universidade Federal da Paraíba – Areia. Em março de 2012 iniciou o Doutorado no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ) da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, concluindo em fevereiro de 2016, depois de defesa, julgamento e aprovação da tese.

Epigrafe

“E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas.
É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá.
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar...”

(Caminhos do coração – Gonzaguinha.)

A Deus,

Aos meus pais Francisco e Nancy,

E a minha irmã Polliana Priscila,

Por todo amor e compreensão,

E por terem sempre acreditado nos meus objetivos.

Sem o apoio e o carinho de vocês eu não estaria aqui.

Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora que sempre me abriu janelas quando as portas se fechavam e por colocar no meu caminho pessoas especiais e por te permitido chegar aonde cheguei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia pela oportunidade de fazer o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade, pela confiança, apoio e inúmeros ensinamentos e por me dar o privilégio de fazer parte da sua equipe.

Ao Prof Dr. Divan Soares da Silva pela co-orientação e contribuições a este trabalho, apoio e inúmeros ensinamentos desde o mestrado.

Ao Prof. Dr. Mailson pela co-orientação e por acompanhar diretamente a pesquisa durante estes últimos meses, sempre auxiliando. Por indicar caminhos e soluções no decorrer do trabalho, como também pelo apoio e confiança dedicados a mim nos momentos que precisei.

Ao Prof. Dr. Adailson Pereira da Silva, pela confiança no uso do seu laboratório, pelos ensinamentos e sugestões na execução do trabalho.

Aos professores examinadores pela atenção e as valiosas contribuições dedicadas a este trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, pelas horas dedicadas.

Aos amigos da pós Graduação, Aurora, Bruna, Rosa, Edgley, Samara, Carla, Jaqueline, Priscilla, Kleitiane, Gilson, Rafael muito obrigada pelas conversas, risadas, ajudas e companheirismo.

Aos amigos do grupo de pesquisa Lavoura Xerófilas, Luiza, Mariah, Meire, Angeline, Alex, Michel, Dinnara, Suelane, Janiere, Ribamar pelos momentos de convivência acadêmica, científica e de descontração.

A todos do Laboratório de Biomassa em especial a Glaucia, pela imensa ajuda durante as análises, dedicação, companheirismos por ter contribuído diretamente para o trabalho.

Às minhas amigas de sempre, Mônica Cintya, Ariana Meira, Mayara Sabedot, Rayssa Bezerril, Gabriela Mafra, Aparecida Oliveira, Adelilian Baracho, Diana Mizael e Ana Barros, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa.

As pessoas queridas de Areia que tive sorte de encontrar: Mariley Dália, Adjamir Neto, Millene Bianka, Isa Araujo, Evanilda Lopes, Jéssika Lopes, Renata Albuquerque, que no decorrer desse tempo me apoiaram nesta etapa da minha vida, tornando sem duvidas meu doutorado mais alegre. Em especial a minha Bi linda Mayara Dália, desde o primeiro encontro soube que dali surgiria uma amizade.

À Andreza Kele pela grande amizade que estamos construimos, pelo apoio nos momentos alegres e nos momentos difíceis. Você é uma criatura linda que Deus colocou em meu caminho, alguém que me ensina a ver a vida com outros olhos. E a toda sua família: Dona Cely, Seu Vavá, Tatianne, Neto, Juan, Murilo, Waleska e Vivian pelo acolhimento fraterno em sua casa, pela presença em minha vida, por não medirem esforços em ajudar e me fazer sentir parte da família, amo vocês!

Aos meus pais, Paulo Neto e Nancy Medeiros, meu infinito agradecimento por terem me dado educação, valores, exemplo de vida e pelo amor dedicado, apoio emocional e financeiro, por sempre acreditaram em minha capacidade e apoiarem minhas decisões.

À minha amada irmã Polliana Priscila, sempre ao meu lado apoiando e vibrando com cada etapa concluída.

À minha GRANDE FAMÍLIA PAULO, tias, tios, primas e primos, pelo carinho e apoio mesmo à distância sempre estiveram presentes em minha vida, me apoiando e incentivando, não vou citar nomes porque são muitos, mas vocês foram e são essenciais em minha vida. Amo tanto cada um de vocês! Em especial a minha vizinha Tereza (*in Memoriam*), minha “veinha” que falta você nos faz!

A todos que de forma direta ou indireta estiveram junto para que eu pudesse vencer mais uma etapa da minha vida com êxito.

A TODOS, MUITO OBRIGADO .

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO GERAL	XVI
Capítulo I.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Incrementos de nutrientes em áreas de Caatinga.....	20
2.2.1 Contribuição das espécies da Caatinga na fixação de nitrogênio.....	26
2.3 Eficiência zootécnica e a importância do uso de leguminosas.....	28
2.4 Exploração do potencial da fixação biológica do nitrogênio	30
2.5 Recuperação de pastagens nativas na Caatinga com o uso de leguminosas.....	32
2.6 Mimosa tenuiflora (Willd) Poiret	35
2.7 Caracterização dos municípios pernambucanos de Arcoverde, São Bento do Una e Sertânia.....	37
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
Capítulo II.....	48
RESUMO:	49
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4. CONCLUSÃO.....	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
Capítulo III	73
RESUMO:	74
ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	80
4. CONCLUSÃO.....	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Capítulo IV	92
RESUMO:	93
ABSTRACT	94
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	100
4. CONCLUSÃO.....	108
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Capítulo II

Tabela 1. Georreferenciamento das áreas de coleta de solos nos municípios de São Bento do Una, Arcoverde e Sertânia, Pernambuco.

Tabela 2. Análise física, química e fertilidade do solo dos municípios de São Bento do Una, Arcoverde e Sertânia, Pernambuco.

Capítulo III

Tabela 1. Condutividade Elétrica do meio de cultura de acordo com os níveis de NaCl aplicados

Capítulo IV

Tabela 1. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares BOX- AIR (PCR) avaliados nos 73 isolados de *Mimosa tenuiflora*.

Tabela 2. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares (PCR-RFLP) avaliados nos 69 isolados de *Mimosa tenuiflora*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Desenvolvimento do nódulo.

Figura 2. Reações metabólicas de fixação biológica do nitrogênio nos bacteriódos.

Figura 3. Mapa do estado de Pernambuco, com destaque para os municípios de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una.

Capítulo II

Figura 1. Mapa do estado de Pernambuco, com destaque para os municípios de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una.

Figura 2. Coleta de solo para análise física, química e para o plantio de fabáceas em casa de vegetação.

Figura 3. Vasos com o plantio da *M. tenuiflora* cultivados em casa de vegetação (A) Nódulos de *M. tenuiflora*(B).

Figura 4. Maceração dos nódulos pertencente a *M. tenuiflora* (A) inoculação pela técnica de esgotamento por estriamento(B).

Figura 5. Isolados crescidos em placas de petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de Vermelho Congo, com produção de goma abundante.

Figura 6. Nódulo segmentado da espécie *Mimosa tenuiflora*.

Figura 7. Massa nodular e produção de matéria seca da parte aérea de *Mimosa tenuiflora* aos 90 dias com solos de três regiões Semiárida pernambucanas.

Figura 8. Produção de exopolissacarídeos em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Figura 9. Diâmetro, forma e coloração da colônia em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Figura 10. Modificação do pH em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Figura 11. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos isolados obtidos da jurema preta, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Capítulo III

Figura 1. Incubação dos isolados para testes de tolerância (A); Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a salinidade (B).

Figura 2. Tolerância a diferentes temperaturas, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Figura 3. Tolerância a diferentes salinidades, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Figura 4. Tolerância as diferentes potencias hidrogênionicos, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Figura 5. Diversidade dos isolados de rizóbios pelos índices de Shannon e Equitabilidade de Pielou cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Figura 6. Dominância de Berger e Parker e Simpson relacionados a isolados nativos cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Figura 7. Riqueza de espécies de Jackknife 1º Ordem relacionados a isolados nativos cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Capítulo IV

Figura 1. Termociclador modelo TC-Plus Techne Bibby Scientific Ltd (Techne TC-412)

Figura 2. Cuba horizontal de eletroforese (A), gel de agarose com as amostras na canaleta (B).

Figura 3. Amplificação dos 84 isolados por REP-PCR com o “primer” específico BOX-AIR visualizados através do fotodocumentador.

Figura 4. Dendrograma resultante da análise de agrupamento obtido pelo método UPGMA a partir de 73 isolados bacterianos provenientes da *Mimosa tenuiflora*, baseado nos dados da matriz de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard.

Figura 5. Resultados da amplificação do fragmento rDNA 16S, via eletroforese em gel de agarose 1,5%, com os *primers* fD1 e rD1. Marcador de 1kb plus DNA Ladder Invitrogen®

Figura 6. Dendrograma resultante da análise de agrupamento obtido pelo método UPGMA a partir de 73 isolados bacterianos provenientes da *Mimosa tenuiflora* baseado nos dados da matriz de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard, utilizando-se PCR-RFLP do gene ribossomal 16S, com a amplificação com os oligonucleotídios fD1 e rD1 digerido com duas enzimas de restrição *HpaII* e *RsaI*.

RESUMO GERAL

No Semiárido brasileiro, a Caatinga constitui a maior parte das pastagens utilizadas para produção animal. Dentre as espécies vegetais as leguminosas são as mais abundantes nessa região, das quais várias apresentam capacidade de formar nódulos em simbiose com bactérias do grupo rizóbio. Essa simbiose pode beneficiar a manutenção da leguminosa em detrimento às demais famílias de plantas, por permitir a fixação biológica do nitrogênio (FBN), além de melhorar a fertilidade do solo rizosférico. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização morfofisiológica e a determinação da diversidade genética de rizóbios da jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), cultivada em diferentes solos da região Semiárido Pernambucano. Para isso, foram utilizados nódulos obtidos através do cultivo de plantas iscas em solo rizosférico proveniente da região em estudo. Essas bactérias foram inoculadas em meio específico sendo obtido um total de 216 nódulos, isolados e repicados em meio LMA, para caracterização morfológica (tempo de crescimento, forma, diâmetro, borda, elevação, transparência e coloração da colônia, produção de goma). Para a caracterização fisiológica, o crescimento desses isolados foi avaliado em diferentes concentrações de salinidade, temperatura e níveis de pH pelo método de avaliação *in vitro*. A análise dos perfis de DNA foi realizada a amplificação (PCR) com o “primer” BOX, que codifica regiões conservadas e repetidas do genoma e os perfis obtidos pela amplificação do gene 16S ribossômico seguido pela digestão com duas enzimas de restrição (técnica de RFLP-PCR). Todos os isolados apresentaram crescimento rápido e em sua maioria não modificaram o pH do meio de cultivo e foram agrupados em 31 grupos distintos com base no coeficiente de Jaccard. Os rizóbios nativos da região semiáridas pernambucanas apresentam resistência a elevadas temperaturas, variação na salinidade e pH. Essas características são influenciadas pela severidade do estresse imposto ao isolado, pelo local e pela espécie botânica em simbiose com os rizóbios. Dentre as áreas estudadas os isolados provenientes da região de Sertânia foram os que mostraram maior tolerância aos estresses ao qual foram submetidos, com o maior índice de diversidade para Shannon e Equitabilidade e menor grau de dominância. A divergência genética entre os 84 isolados foi estimada mediante o uso de marcadores moleculares PCR - RFLP. Com os dados obtidos com as reações foi construída a matriz de dissimilaridade utilizando o complemento (1-C) do coeficiente de similaridade Jaccard. Com base na matriz de dissimilaridade foi realizada análise de agrupamento método de UPGMA utilizando

programa genes. Pôde-se observar a formação de 9 grupos e de 10 grupos, respectivamente, para as análise dos perfis com o “primer” BOX e os perfis obtidos pela amplificação do gene 16S ribossômico seguida pela digestão com duas enzimas de restrição. Os resultados enfatizam a diversidade genética elevada de rizóbios, inter e intraespecífica, nos solos pernabucanos.

Capítulo I

REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

No Semiárido brasileiro, a Caatinga integra a maior parte das pastagens usadas pelos rebanhos de bovinos, caprinos e ovinos (SAMPAIO & MENEZES, 2002). Esse ecossistema, predominantemente é explorado de forma extensiva para obtenção de produtos de origem pastoril, agrícola ou madeireiro. Apresentando baixa sustentabilidade, devido ao uso de tecnologia quase sempre agressiva ao ecossistema. Portanto, é necessário o desenvolvimento de modelos de produção sustentáveis para aumentar a biodiversidade nesse ecossistema, além dos índices de produção animal com reduzida dependência de insumos externos.

O cultivo de leguminosas que apresentem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio seria uma alternativa para assegurar a sustentabilidade do sistema, devido às limitações que os fatores ambientais impõem aos ecossistemas dessa região, seja como fonte de nitrogênio ao sistema, via Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), seja como melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (OLIVEIRA et al., 1998) estimulando a ação microbiana e, conseqüentemente, melhorando a eficiência e reciclagem de nutrientes. Porém, esse potencial permanece ainda pouco explorado no setor agropecuário pela falta de conhecimento das espécies que traduza as reais possibilidades de utilização (ARAGÃO & MARTINS, 1996).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta, onde microrganismos, conhecidos como diazotróficos, são capazes de quebrar a ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico (N_2), transformando-o em amônia (NH_3), que é assimilável pelas plantas (JUNIOR & MENDES, 2008). A associação entre estes micro-organismos e as leguminosas sendo eficiente, o N fixado pode suprir as necessidades do vegetal, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados e oferecendo, assim, vantagens econômicas e ecológicas.

Estudos sobre caracterização morfofisiológica e molecular de rizóbios nativos e eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN), em plantas nativas da Caatinga, adaptados ao clima semiárido e aos fatores que interferem na nodulação como, pH, salinidade e altas temperaturas, é uma contribuição de maneira direta e indispensável para o entendimento de processos adaptativos dessas bactérias ao meio ambiente, podem promover o conhecimento ecológico e a classificação taxonômica desses rizóbios nativos através da seleção de bactérias mais eficientes e adaptáveis a seu

ambiente específico, bem como gerar informação sobre a funcionalidade dessas bactérias em ambientes semiáridos e uma possível domesticação dessas estirpes pode ser a “chave” para a melhoria na oferta de forragem para ruminantes sendo essa de boa qualidade.

A FBN por esses microrganismos pode favorecer a recuperação de áreas degradadas em função das suas características recuperadoras do solo, melhoria da gestão empregada à vegetação nativa, enriquecimento de pastagens cultivadas e sistemas agroflosilvopastoris.

Este estudo teve como objetivo o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios de isolados provenientes de nódulos da jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), verificando as diferenças entre estirpes de bactérias com relação à tolerância a NaCl, temperatura e pH empregando método de avaliação *in vitro* e a determinação da diversidade genética de rizóbios cultivada em diferentes solos da região Semiárido Pernambucano.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Incrementos de nutrientes em áreas de Caatinga

O Nordeste Brasileiro é um centro de diversificação e distribuição das leguminosas forrageiras, porém este potencial permanece ainda pouco explorado no setor agropecuário pela falta de conhecimento das espécies que traduza as reais possibilidades de utilização (ARAGÃO & MARTINS, 1996). As leguminosas representam uma das famílias dominantes na Caatinga, formando um dos principais recursos naturais da flora nativa e importante fonte de alimentação animal. Segundo Seganfredo (1995) essas espécies são excelentes opções para o suprimento de nitrogênio a ser transformando em proteína, principalmente por ruminantes.

Da composição botânica da Caatinga a família Fabaceae apresenta-se bastante representativa, pois dos seus 727 gêneros e 19.327 espécies (LEWIS *et al.*, 2005), ocorrem 210 gêneros nativos e 2.695 espécies. No Brasil, estando entre as famílias mais ricas na maioria dos ecossistemas brasileiros (LIMA *et al.*, 2010). Na Caatinga, ocorrem 89 gêneros e 293 espécies, constituindo cerca de 40% da riqueza do bioma (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A abundância de espécies de leguminosas nessa região pode estar associada diretamente com a microbiota do solo. Essa simbiose pode beneficiar a manutenção da leguminosa em detrimento às demais famílias de plantas, por permitir a fixação biológica do nitrogênio, além de melhorar a fertilidade do solo rizosférico (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A maioria dos solos, tanto os cultivados quanto os sob vegetação nativa, são deficientes em nitrogênio, e para garantir uma boa produtividade das plantas é necessário que este nutriente seja aportado ao sistema através da adição de compostos ricos em nitrogênio. Para a agropecuária de subsistência do Semiárido, o fertilizante químico é pouco usado porque o risco de não pagar o investimento é grande. Assim, o nitrogênio fixado pela associação de bactérias com leguminosas, pode representar uma alternativa importante, com as vantagens de ser economicamente mais viável para a região Semiárida.

Dos nutrientes minerais essenciais às plantas e aos animais, o N é considerado o mais dinâmico do sistema, tendo suas formas minerais absorvíveis pelas plantas (íons, amônio e nitrato) bastante variáveis e dependentes das condições climáticas e da qualidade dos resíduos culturais (OLIVEIRA, 2000). O nitrogênio é um dos nutrientes mineral de maior contribuição para a produtividade das pastagens, e exigidos em maiores quantidades pelas plantas, principalmente quando não há restrição dos demais elementos necessários ao desenvolvimento das plantas (LUGÃO *et al.*, 2003). Esse efeito pode ser explicado pelo incremento da fotossíntese, pela sua participação na síntese de clorofila e, também, pelo seu papel na síntese das enzimas PEPC e Rubisco (fosfoenolpiruvato carboxilase e ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase, respectivamente), que participam da fixação do CO₂ atmosférico. Além disso, está presente em diversas outras estruturas e enzimas, bem como bases nitrogenadas, glicoproteínas, lipoproteínas etc. (MALAVOLTA *et al.* 1997).

As leguminosas fixadoras de nitrogênio também promovem o acúmulo de quantidades substanciais de carbono (C), que pode favorecer melhorias nas propriedades físicas e químicas, aprimoramento das atividades biológicas e aumento na disponibilidade de nutrientes. Tarré *et al.* (2007), trabalhando com espécies de gramíneas e leguminosas tropicais evidenciaram incrementos de carbono no solo da ordem de 20%, demonstrando a importância de sua atuação e reforçando a necessidade de maiores estudos de seus impactos no processo de sequestro de carbono.

Teodoro et al. (2011), avaliando o comportamento e as potencialidades de leguminosas herbáceas perenes para o uso como cobertura permanente em solos da região da Caatinga Mineira, observaram contribuição significativa para o incremento de nitrogênio, aporte de outros macronutrientes (K, P, Ca e Mg), incremento da matéria orgânica no solo e aumento da atividade biológica.

Isto é possível devido ao seu sistema radicular profundo e bastante ramificado, capaz de extrair estes nutrientes das camadas subsuperficiais, colocando-os à disposição de outras culturas através do processo de reciclagem (FRANCO & SOUTO, 1984), contribuindo, para a melhoria da estrutura e aumentando o fluxo de água no solo. Essa melhoria na estrutura do solo, na capacidade de armazenamento de água, pode aumentar o poder tampão do solo (pelo aporte de matéria orgânica) e quebrar ciclo de patógenos, contribuindo decisivamente para um maior período produtivo da pastagem, assim sendo, os efeitos das leguminosas resultam em melhorias da produção animal (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Isso ocorre de forma indireta, em função de seu efeito sobre a biodiversidade do ecossistema pastagens e incorporando grandes quantidades de nitrogênio atmosférico no sistema solo - planta (MOREIRA, 1994), proporcionando um maior equilíbrio nutricional para as plantas e maior resistência do sistema ao aparecimento de pragas e doenças. Essas características contribuem para o desenvolvimento de outras espécies vegetais, garantindo a autosustentabilidade do ecossistema com relação ao nitrogênio.

De forma direta em função da melhoria do valor nutritivo da dieta animal (BARCELO & VILELA, 1994), uma vez que o maior aporte de N aumenta a densidade da forragem e, sobretudo, está diretamente correlacionada à produção de fitomassa, ao tamanho das folhas, ao desenvolvimento de perfilhos e tamanho dos colmos nas gramíneas.

Para que o nitrogênio proveniente da fixação biológica possa suprir todas as necessidades da planta, o processo necessita ser eficiente, o que resulta, principalmente, da escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao microsimbionte (HUNGRIA *et al.*, 1994). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, são alguns dos gêneros de bactérias que crescem no solo e infectam plantas leguminosas, estabelecendo relações simbióticas e esses organismos são coletivamente denominados de rizóbios.

O processo de fixação biológica de nitrogênio está dividido em etapas distintas: multiplicação do rizóbio no solo e na rizosfera da planta, emissão de sinais quimiotáticos, reconhecimento, formação do cordão de infecção, desenvolvimento do nódulo, fixação nitrogênio (VARGAS & HUNGRIA, 1997; FERGUSON & MATHESIUS, 2003) (Figura 1) ou através de fisuras que ocorrem na planta. O rizóbio tem a capacidade de viver livre no solo, competindo com os demais microrganismos pelos recursos disponíveis (KEYSER, *et al.* 1997), o que pode diminuir significativamente a população de determinada espécie de rizóbio no solo na ausência de uma planta hospedeira, mas na presença desta, há um processo de interação química e molecular entre o rizóbio e a planta.

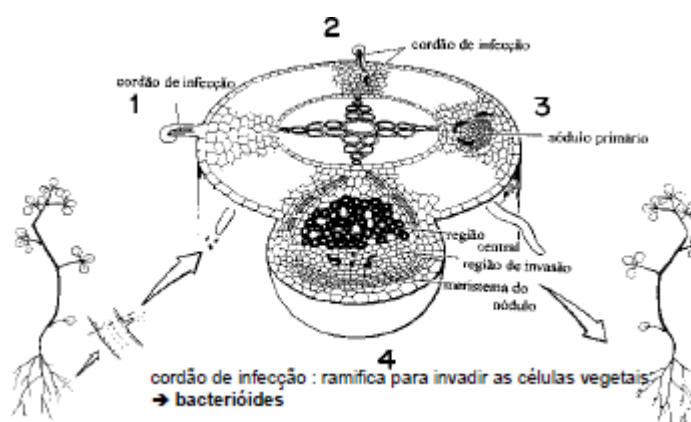


Figura 1. Desenvolvimento do nódulo.

Na fixação biológica, o N_2 é reduzido à amônia (NH_3) à custa de energia da plantas, obtida da oxidação dos carboidratos produzidos na parte aérea da planta hospedeira (FRANCO & NEVES, 1992; SILVEIRA *et al.*, 2001), fornecida ao sistema enzimático pela planta, sob forma de ATP, proveniente da fotossíntese. O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas responsáveis pela reação de redução do N_2 . A nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a Ferredoxina (TAÍZ & ZIEGER, 2004) (Figura 2).

Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase: um que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe); outro em que o vanádio (V) substitui o Mo (nitrogenase-2); e um terceiro, que só tem ferro (nitrogenase-3) (PAU *et al.*, 1989). A fisiologia dos microrganismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes desta enzima. São elas: alta sensibilidade ao oxigênio; necessidade dos metais Fe, Mo ou V, seus componentes estruturais; suprimento adequado de poder redutor; MgATP

para a sua atividade; ambiente onde o nitrogênio combinado não esteja disponível. A nitrogenase é uma enzima relativamente lenta e para produzir níveis adequados de nitrogênio fixado o conteúdo enzimático em bactérias diazotróficas é de aproximadamente 10% da proteína celular total (KLUGKIST et al., 1985). Também é uma enzima dispendiosa em termos energéticos, consumindo duas moléculas de ATP para cada elétron transferido pelo sítio catalítico (HOWARD; REES, 1996). Além da regulação da expressão gênica, a nitrogenase também é regulada no âmbito enzimático em muitos organismos.

A fixação do nitrogênio atmosférico dá origem à amônia que em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacteróides é convertido, rapidamente, em amônio que é imediatamente conduzida para fora do bacteróide e incorporada a esqueletos de carbono gerando o glutamato e a glutamina. Esses dois aminoácidos atuam como doadores de N, transportados para as folhas das plantas através do xilema (CRAWFORD & GLASS, 1998; SILVEIRA *et al.*, 2001).

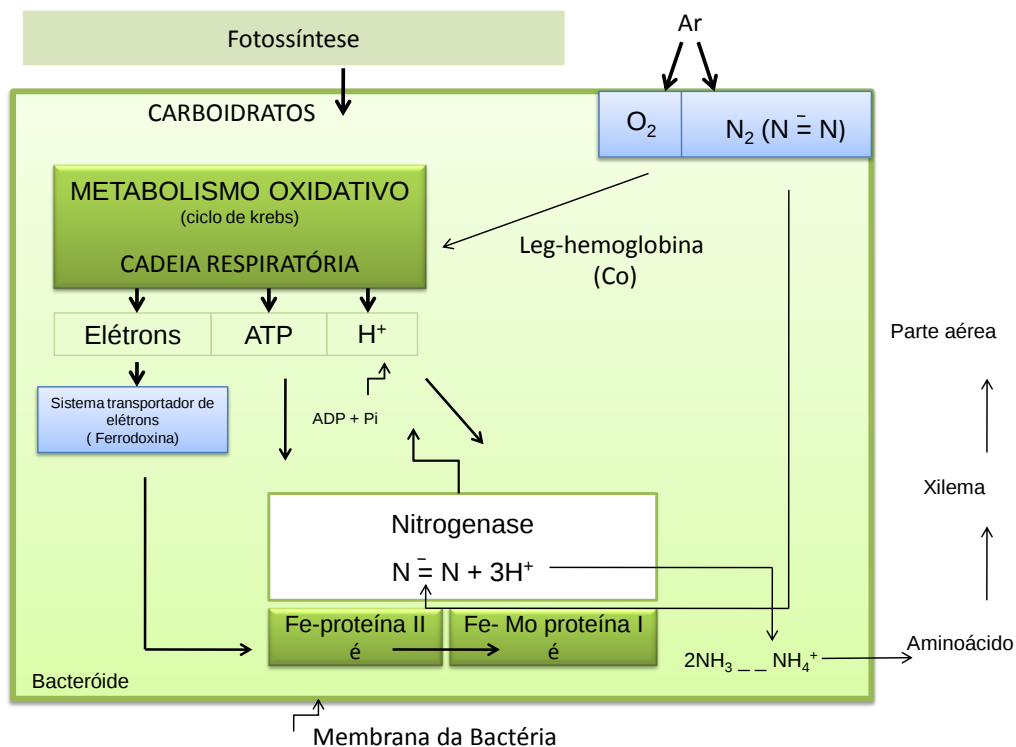


Figura 2. Reações metabólicas de fixação biológica do nitrogênio nos bacterióides.

A liberação do nitrogênio fixado biologicamente responderá em grande parte pela manutenção da produtividade das espécies ao seu redor. O nitrogênio será

transferido abaixo e acima da superfície do solo, como diretamente ou indiretamente para a planta mais próxima, seja pela excreção de N na rizosfera da leguminosa, pela decomposição de raízes e nódulos, ou ainda pela ação da fauna do solo sobre raízes e nódulos da leguminosa. Assim, a maior parte do N da parte aérea será ciclada por meio da serapilheira. Na superfície do solo, ocorrerá pela decomposição da serapilheira de folhas, pela lixiviação de compostos nitrogenados do dossel da pastagem e com as perdas foliares de amônia, passível de absorção. Haverá ainda a ciclagem do N pela excretas (fezes e urina) dos animais em pastejo, onde o N ingerido pelo animal retorna à superfície do solo como excreta, que é a via mais rápida do que a da serapilheira (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Além da FBN, a maioria dessas bactérias também é conhecida pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento das plantas. Os efeitos positivos desses organismos podem ocorrer por influência direta aumentando a solubilização e entrada de nutrientes, produção de reguladores de crescimento vegetal estimulando o aumento da densidade de pelos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular ou indireto na supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos (ASGHAR *et al.*, 2002). Esse incremento resulta em melhoria na absorção de água e nutrientes, aumentando assim a capacidade de a planta produzir e suportar estresses ambientais.

Como já mencionado anteriormente, a leguminosa aumenta a disponibilidade de nitrogênio no sistema solo-planta-animal, podendo incrementar os níveis de fixação de carbono ao solo, além de reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa por unidade de produto produzido. Segundo Barcellos *et al.* (2008), os sistemas de produção animal convivem, permanentemente, com o ônus dos impactos gerados pela atividade e sua relação com o aumento na emissão de gases do efeito estufa, principalmente o metano e o óxido nitroso. Monteny (2003) descreve que a produção animal apresenta participação na emissão de gases do efeito estufa, como metano e óxido nitroso.

As leguminosas forrageiras apresentam concentrações consideráveis de compostos do metabolismo secundário das plantas, como, por exemplo, taninos que associados à proteína alimentar, diminuem sua disponibilidade aos microrganismos metanogênicos reduzindo com isso a emissão de metano metabólico (MONTENEGRO, *et al.*, 2000). Dessa forma, poderiam ser obtidos significativos aumentos na fixação de carbono ao solo, bem como reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa por unidade de produto produzido.

Os estudos referentes ao papel das leguminosas como componente no processo de mitigação dos GEE são muito reduzidos, principalmente em ambientes semiáridos. Os benefícios das leguminosas no desenvolvimento na produção primária de forragem, no desempenho animal e nos impactos sobre as propriedades químicas e biológicas do solo reforçam a necessidade de expansão desses estudos (BARCELLOS *et al.*, 2008).

2.2.1 Contribuição das espécies da Caatinga na fixação de nitrogênio

Muitas espécies de leguminosas fixadoras de nitrogênio da flora nordestina possuem importância econômica potencial, como *Turdus rufiventris*, *Ananás ananassoides*, *Mimosa tenuiflora*, *Mimosa artemisiana*, *Erythrina mulungu*, *Dipteryx odorata*, *Desmanthus virgatus* e *Macroptilium lathyroides*. Leguminosas exóticas, como *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* e *Prosopis Juliflora*, também fixam. Mas, outras espécies como *Caesalpinia Pyramidalis*, *Bauhinia Cheilantha*, *Senna Spectabilis* e *Caesalpinia Ferrea* não fixam nitrogênio atmosférico (FREITAS, 2010).

Muitos esforços têm sido feitos no Brasil para identificar espécies de bactérias capazes de FBN (FARIA *et al.*, 1989; MOREIRA *et al.*, 1992; SOUZA *et al.*, 1994), porém, estudos realizados se restringiram principalmente a espécies das regiões Sudeste e da Amazônia. Apesar da importância da Fixação Biológica de Nitrogênio para as leguminosas forrageiras no Semiárido, poucos estudos tem sido conduzidos sobre o tema (FREITAS *et al.*, 2011) e as características dos micros simbioses permanecem poucos estudadas.

Uma vez que o crescimento vegetal na maioria dos solos Semiáridos é limitado pela disponibilidade de nitrogênio, a fixação biológica desse mineral é um processo de ganhos significativos de produção a um custo relativamente baixo. A estimativa da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas iria aumentar o conhecimento de fixação na vegetação nativa do Semiárido.

Freitas e Sampaio (2008), avaliando a eficiência na fixação de nitrogênio em leguminosas arbóreas nativas da Caatinga, observaram que das 32 espécies estudadas, 20 delas apresentaram a capacidade de formar simbiose com os rizóbios nativos dos solos do Semiárido da Paraíba e Pernambuco. Santos *et al.* (2007), estudando a diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas em solo pernambucano observaram que solos dessa região possui alta diversidade de rizóbios capazes de

nodular diversos gêneros de leguminosas, essa alta diversidade pode ajuda na seleção de estirpes adaptadas, competitivas e aptas a fixar nitrogênio, contribuindo significativamente para o aumento no aporte de nitrogênio no ecossistema.

A fixação biológica do nitrogênio é de fundamental importancia para ciclagem de nutrientes, sendo uma alternativa para sistemas agropecuários no Semiárido. Paulo (2012), estudando o potencial de bactérias capazes de fixar nitrogênio associados a leguminosas forrageiras do Semiárido paraibanos observaram que as leguminosas tiveram uma abundante nodulação e diversidade, estes microssimbiontes também conferiram uma capacidade de crescer em ambiente de estresse de temperatura, pH e salinidade, conferindo uma adaptação dessas bactérias as condições a que são submetidas com frequencia.

Freitas *et al.* (2010), avaliaram o potencial de fixação biológica de plantas arbustivas-arbóreo da Caatinga, utilizando a técnica da abundância natural de ^{15}N , com valores de até 68% N da planta oriundos da fixação biológica de nitrogênio. Das espécies identificadas com potencial para corrigir uma grande quantidade de N_2 e as espécies que se destacaram foram *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, *M. arenosa* (Willd.) Poir, e *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. Em situações de regeneração da vegetação nativa, quando a sucessão é marcada pela fixação biológica pode chegar a $130 \text{ kgNha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Em estudo subsequente, Freitas *et al.* (2011), analisando leguminosas forrageiras de porte herbáceo e subarbustivo comuns na caatinga paraibana, observaram que os valores superaram 50%, chegando a 85%. Esses dados permitem estimar a capacidade de fixar em campo de 10 a 30 $\text{Kg ha}^{-1} \text{ N}$.

A região Semiárida possui características peculiares, estando toda a sua biodiversidade em condições de constante estresse, seja a irregularidade da precipitação, salinidade ou temperatura (SANTOS *et al.*, 2007). Os poucos estudos realizados nesse ecossistema sempre demonstram uma alta diversidade de bactérias capazes de fixar o nitrogênio (MARTINS *et al.*, 1997; STAMFORD *et al.*, 1998; XAVIER *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010), é possível que essa alta diversidade observada seja uma indicação da capacidade do sistema de manter funcionando, tolerando seus estresses, isto pode ser resultado de um processo de adaptação dos rizóbios juntamente com a grande diversidade de leguminosas nativas da Caatinga. Sugerindo alta capacidade de adaptação dessas bactérias, conferindo uma vantagem a mais, podendo contribuir para uma melhor gestão da vegetação nativa como

pastagens ou agricultura e seleção das árvores para ser utilizado em sistemas agro-florestais.

2.3 Eficiência zootécnica e a importância do uso de leguminosas

Os aspectos sociais e mercadológicos para ovino-caprinocultura nordestina são inegavelmente favoráveis. Entretanto, ainda é baixo o desempenho zootécnico desta atividade, principalmente, pela forte dependência que os sistemas de produção têm da vegetação nativa da Caatinga, fonte alimentar básica, quando não única, dos rebanhos (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Naturalmente é no período de transição que os animais usufruem melhor as pastagens nativas, nessa época que a oferta de massa verde disponível se encontra em grande quantidade, com maior diversificação. Além disso, a forragem natural, é o alimento mais barato que existe, sendo a forma mais prática e de menor custo ao alcance de todos os pecuaristas (GUIMARÃES FILHO, 2006). Porém, a acentuada redução anual na oferta de forragem, durante as estações secas, é o principal fator determinante do nível de produtividade dos sistemas de criação de caprinos e ovinos no Semiárido (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Neste contexto, torna-se importante a adoção de técnicas de manejo, e uma das possibilidades viáveis em modelos extensivos consiste na inserção de leguminosas fixadoras de nitrogênio atmosférico (SCHUNKE, 2004), evidenciando a forma mais econômica de enriquecimento dos solos com nitrogênio, podendo despontar como uma alternativa aos sistemas tradicionais de produção de forragem e ajuda na segurança alimentar nos períodos de escassez (SAMPAIO *et al.*, 1995). Inúmeros trabalhos indicam aumentos no ganho ou manutenção do peso de animais durante o período da seca como resultado da melhor qualidade das leguminosas (BARCELLOS *et al.*, 2008).

A introdução de leguminosas adaptadas nas pastagens pode melhorar não somente a disponibilidade de nitrogênio no solo como aumentar os teores de proteína na dieta dos ruminantes. Este nutriente apresenta grande interesse na nutrição animal, devido seu alto custo e seu potencial limitante no sistema de produção (VALADARES FILHO *et al.*, 2006). Ampliar a capacidade de produção animal, melhorando o valor nutritivo da forragem, representa alternativa de menor impacto quanto à necessidade de investimentos e de forte apelo ambiental e produtivo (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Sampaio *et al.* (2002) mencionam que a folhagem das leguminosas tem grande importância, pois já se constatou que uma significativa proporção da forragem removida pelos animais em pastejo, é proveniente de arbustos e em regiões como o Semiárido ela representa a maior parte do material disponível, quando as condições ambientais são desfavoráveis. De acordo com Araújo Filho e Crispim (2002), durante a estação das chuvas, a maior parte da forragem é proporcionada pelo estrato herbáceo, com baixa participação da folhagem de árvores e arbustos. No entanto, à medida que a estação seca se pronuncia, a folhagem das espécies leguminosas, passa a constituir a principal fonte de forragem para os animais.

De acordo com Garcez *et al.* (2014), as forrageiras nativas têm um período relativamente curto de crescimento, que ocorre apenas no período chuvoso, época em que é capaz de suprir as exigências de algumas categorias de animais. Neste sentido, Araújo Filho *et al.* (2000) estudaram a composição química de folhas de leguminosas em diferentes fases vegetativas e constataram que, em termos de proteína bruta, os valores encontrados foram superiores ao mínimo de 7% necessário à dieta dos ruminantes. Segundo Garcia (1977), o declínio em valor nutritivo é significativo, na medida em que a seca se acentua, especialmente no caso das plantas herbáceas. Por outro lado, as leguminosas arbustivas e arbóreas apresentam uma maior duração de crescimento anual e mantêm o seu valor nutritivo por período mais prolongado, com menor variação estacional do valor nutritivo, em comparação as gramíneas.

Segundo Garcez *et al.* (2004) a inclusão de leguminosas sob várias formas em dietas para cabras em lactação melhora a produção de leite, sem interferir na qualidade do leite e no custo de produção. A utilização de leguminosas nas pastagens constitui um dos métodos mais importantes e econômicos de adicionar nitrogênio ao sistema solo-planta-animal. Uma vez que o crescimento vegetal na maioria dos solos da região Semiárida é limitado pela disponibilidade de nitrogênio, a fixação biológica desse mineral é um processo que pode trazer ganhos significativos de produção a um custo relativamente baixo (FREITAS *et al.*, 2011).

As leguminosas forrageiras contribuem diretamente para incrementar o desempenho dos animais, uma vez que o maior aporte de N aumenta a densidade da forragem e, sobretudo, está diretamente correlacionada à produção de fitomassa, ao tamanho das folhas, ao desenvolvimento de perfilhos e tamanho dos colmos, (BARCELO & VILELA, 1994), promove de forma a melhoria do valor nutritivo da dieta animal, contribuindo para incrementar o ganho em peso bem como fornecendo e

propiciando melhoria de parâmetros ruminais além de reduzir a metanogênese, principalmente por apresentar concentrações consideráveis de compostos do metabolismo secundário das plantas (MONTENEGRO *et al.*, 2000).

A presença desses metabólitos está relacionada ao processo evolutivo das plantas, como forma de disseminação e proteção contra a ação de predadores, como fungos, bactérias e insetos ou animais. Os taninos em especial têm importante papel na nutrição animal, podendo exercer efeitos ou benefícios na utilização de nutrientes, na saúde e na produção animal.

São ainda mencionados efeitos benéficos quanto à eliminação de riscos de timpanismo, ação anti-helmíntica, redução da degradação de proteína e maior eficiência na reciclagem da uréia no rúmen. Incremento na produção de saliva pela presença de tanino na dieta tem sido observado. Considerando que a saliva desempenha papel importante na reciclagem de uréia, notadamente, em raças zebuínas, podem ser esperados reflexos sobre a disponibilização de nitrogênio para produção de massa microbiana do rúmen (BUTTER *et al.*, 1999).

Além das vantagens apresentadas, as leguminosas apresentam menor resistência à quebra de partículas durante a alimentação e ruminação, devido à menor quantidade de constituintes da parede celular e à maior proporção de conteúdo celular, quando comparado às gramíneas (MINSON, 1990). No que diz respeito aos aspectos digestivos, as leguminosas (C3) são digeridas mais rapidamente que as gramíneas tropicais (C4), possuem menor perda de valor nutritivo em função do tempo e possuem ritmo de passagem mais rápido no retículo-rúmen, em função de diferenças anatômicas, via fotossintética e mecanismos físicos e fisiológicos que interagem no rúmen (WILSON e MINSON, 1980; NORTON & POPPI, 1995).

2.4 Exploração do potencial da fixação biológica do nitrogênio

As leguminosas são de grande importância seja como fonte protéica para os animais, seja como suprimento de nitrogênio ao sistema, via Fixação Biológica de Nitrogênio, seja na melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (OLIVEIRA *et al.*, 1998). O cultivo de leguminosas com essa simbiose seria uma alternativa para assegurar uma boa alimentação aos animais principalmente no período seco onde permanece verde já que, são espécies mais resistentes aos períodos de estiagem com boa capacidade de rebrota, alto valor protéico, boa digestibilidade,

melhorando a qualidade da forragem e agressividade na colonização e na formação de banco de proteína (SANTOS *et al.*, 2008).

O fornecimento de leguminosas aos animais pode ser realizado por meio de podas, que mantenham os ramos em altura apropriada para o ramoneio, ou através de desramas programadas, com o intuito de dispor os galhos mais altos, para o aproveitamento dos animais. Outro potencial de uso de leguminosas é o aproveitamento da forragem produzida para a confecção de feno e silagem, das espécies que possuem aceitabilidade pelos animais. Destacando-se que os fenos de leguminosas são superiores aos de gramíneas em proteína e cálcio, com influência favorável destas sobre o desempenho animal (PÁDUA *et al.*, 2006). Neste sentido, a utilização de feno de leguminosas como suplemento de dietas é uma alternativa para atender esta demanda, sendo algumas adaptadas às condições de baixa pluviosidade.

Dados experimentais ressaltam a melhoria da produção animal promovida pela presença da leguminosa, seja pela participação direta deste vegetal na dieta do animal ou pelos efeitos indiretos relacionados com o aumento do aporte de nitrogênio ao ecossistema da pastagem (ANDRADE *et al.*, 2003), podendo aumentar a possibilidade de sucesso dos sistemas de produção pecuária do Semiárido nordestino.

Na adoção da prática da adubação verde, realizada com espécies da família Fabaceae, pode significar uma estratégia importante na busca da sustentabilidade dos agroecossistemas nesse bioma, visto os benefícios proporcionados ao solo, como melhorias das características físicas tais como agregação e incremento no teor de carbono orgânico no solo (PERIN *et al.*, 2002), aporte de fitomassa e nutrientes (PRADO, 2014), fornecimento de N pela fixação biológica (Freitas *et al.*, 2011), diminuição da temperatura e amplitude térmica, maior retenção da umidade e inibição de plantas espontâneas (TEODORO *et al.*, 2011), proteção permanente contra os principais agentes causadores da degradação dos solos.

Os sistemas de produção agrossilvipastoris que integram a exploração de lenhosas perenes com culturas e pastagem vêm sendo propostos como alternativas ecologicamente sustentáveis para o Semiárido. O uso de leguminosas arbóreas, tanto no campo agrícola, como no pastoril, constitui garantia de manter ativa a circulação de nutrientes e o aporte significativo de matéria orgânica, condição essencial para se cultivar, de maneira continuada, os solos tropicais. Para o Nordeste, as técnicas de manipulação da caatinga utilizadas nos sistemas agrossilvipastoris, como raleamento, rebaixamento e/ou enriquecimento, proporcionam o desempenho sustentado da

pecuária, melhorando qualitativa e quantitativamente a oferta de forragem durante todo o ano, tanto no estrato arbustivo-arbóreo (ARAÚJO FILHO, 1990), favorecendo o desempenho sustentável da pecuária.

A Embrapa Caprinos, situada no município de Sobral/CE, possui campos experimentais com sistemas agrossilvipastoris, onde a produtividade média de milho, de 1200 kg/ha, já dura nove anos. Nestes sistemas, a disponibilidade de forragem em relação à fitomassa total e a produção animal (kg peso vivo/ha/ano) são maiores quando comparadas aos valores encontrados na caatinga nativa (ARAÚJO FILHO *et al.*, 2006). Carvalho (2003), estudando sistemas agrossilvipastoris para o semiárido observou que cordeiros acompanhados do nascimento a desmama apresentaram maior peso ao nascer e maior ganho de peso médio diário, assim como maior produção de cordeiros desmamados, quando comparados com o sistema tradicional.

Problemas ligados ao desenvolvimento de Sistemas Agroflorestais- SAF's na Região Semiárida do Nordeste está relacionado à falta de tradição do segmento florestal na região, desconhecimento dos benefícios dos Sistemas Agroflorestais-SAFs, falta de pesquisas que quantifiquem e qualifiquem as melhores alternativas agroflorestais, por zona agroecológica e o desconhecimento de práticas conservacionistas pelo uso de SAFs.

2.5 Recuperação de pastagens nativas na Caatinga com o uso de leguminosas

Segundo dados do IBAMA (2014) a Caatinga é hoje o bioma brasileiro mais alterado com aproximadamente 80% de antropização, faz com que a caatinga esteja hoje entre as maiores áreas dentro do território nacional que passam por processo de desertificação. Até 2008, 45% de sua vegetação original já havia sido desmatada e a degradação do bioma continua crescendo a uma taxa de 0,33% ao ano (MMA, 2010).

Os sistemas de subsistência explorados na área do bioma Caatinga são os principais responsáveis por uma contínua e crescente degradação dos seus recursos físicos e bióticos na região, a qual já atinge mais de 20 milhões de hectares, correspondendo a 22% da região Semiárida (SÁ & ANGELOTTI, 2009).

As causas do processo de degradação na região Semiárida está diretamente relacionada com a ação antrópica, principalmente, com o manejo inadequado do solo através das atividades agropecuárias da caatinga, ao extrativismo predatório, uso descontrolado do fogo como método de limpeza dos pastos e juntamente com as estiagens prolongadas e as chuvas, pois apesar de esporádicos os eventos chuvosos

apresentam-se em algumas épocas e locais com grande intensidade, o que associado à baixa eficiência dos sistemas agrícolas em proteger os solos, resulta em eventos degradantes de grande magnitude (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002).

Entretanto, a sustentabilidade destas áreas da Caatinga pode ser alcançada por meio do manejo adequado do solo no Semiárido, em que se ressalta o uso das leguminosas que associadas a outras tecnologias, podem minimizar os reflexos diretos e indiretos desse cenário (CARVALHO *et al.*, 2008), em escala local e nacional, em função de suas características recuperadoras de solo, potencialmente, podem desempenhar, não se restringindo apenas às cadeias de produção de carne e leite, contribuem também melhorando a cobertura e fertilidade do solo.

A utilização de leguminosas para recuperar áreas degradadas ou em processo de degradação se dá por meio da existência de um grande número de espécies que ocorrem na região e à relativa facilidade na obtenção de sementes. Mas a principal preferência pelo uso das espécies leguminosas, ocorre pela característica especial que elas possuem em relação às outras plantas, que é a capacidade de se associarem com microrganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados assimiláveis pelos vegetais, podendo tornar a planta parcial ou totalmente independente do aporte externo desse nutriente.

A fixação biológica de nitrogênio é uma ferramenta de suma importância para diminuir os impactos gerados pelo manejo inadequado, pela exploração excessiva podendo ser utilizada em áreas degradadas. Para Nóbrega & Nóbrega (2003) é um dos componentes da sustentabilidade, pois o processo não polui e enriquece o solo com nitrogênio, sendo uma alternativa acessível ao produtor, uma vez que reduz a dependência de insumos nitrogenados, o custo de produção, o impacto ambiental da atividade agropecuária e ao mesmo tempo, auxilia na recuperação de áreas degradadas.

De acordo com Franco e Campelo (2005), as leguminosas fixadoras de nitrogênio são as mais indicadas para aumentar o conteúdo de matéria orgânica de solos degradados de sistemas produtivos em condições de baixa fertilidade, acelerando o processo de sucessão vegetal.

O uso de leguminosas no processo de recuperação de pastagens degradadas tem ganhado destacada importância. O emprego de espécies leguminosas fixadoras de nitrogênio com o intuito de reduzir os impactos ambientais é uma alternativa que visa incrementar a qualidade do solo. As leguminosas arbóreas contribuem para a recuperação do solo pela deposição de material com baixa relação C/N, assim como

pela ação das raízes, pois para cada 10 unidades de carbono sequestrado há a necessidade de imobilizar, em média, uma unidade de nitrogênio (SISTI *et al.*, 2004).

A exploração efetiva da fixação biológica de nitrogênio utilizando leguminosas arbóreas com a finalidade de reverter o quadro de degradação do solo são diversos dentre eles estão à adubação verde e consorcio em sistemas agroflorestais, com seus benefícios já citados anteriormente.

Os Sistemas agroflorestais (SAF's) pode ser uma tecnologias para recuperação e uso sustentável de áreas degradadas, com ênfase em sistema de produção da agricultura familiar no Semiárido nordestino, contribuindo para o uso sustentável dos recursos naturais renováveis de ecossistemas no Nordeste brasileiro, sustando os processos de desertificação patentes na região. Além do melhoramento de extensas áreas de pastagens nativas do Semiárido nordestino com base na recuperação de sua fertilidade natural e consequente incremento da biodiversidade de seu estrato herbáceo forrageiro.

De acordo com Carvalho (2003), os sistemas agrossilvipastoris desenvolvidos para a região Semiárida ajudam na fixação da agricultura, com a eliminação das queimadas e do desmatamento e com o aporte de matéria orgânica; promovem a adequação do manejo pastoril, através do ajuste da taxa de lotação; melhoram o manejo da vegetação nativa; e causam a racionalização da extração de madeira, por meio do corte seletivo e manejo das rebrotações e a redistribuição dos nutrientes no agroecossistema. Além disso, diversificam a produção, elevam a produtividade da terra, melhoram a renda e a qualidade de vida dos agricultores (Araújo Filho *et al.*, 2006).

A Embrapa Agrobiologia em parceria com a UN-RNCE (unidade de Negócio de Exploração e Produção do Rio Grande do Norte e Ceará), estão desenvolvendo um projeto utilizando como base sistemas agroflorestais (SAF's) para recuperação de solos. A fim de recuperar a Caatinga original e manter o equilíbrio do ecossistema, são plantadas espécies nativas, como a jurema preta, a jurema branca, o sabiá e o jucá com inoculação de mudas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos. Inicialmente estão foram recomendadas 11 espécies florestais nativas da Caatinga, das quais 7 são leguminosas fixadoras de nitrogênio e que apresentaram resultados muito satisfatórios para as condições avaliadas. A tecnologia apresenta grande potencial para ser replicada em outras situações do bioma, recuperando funções do ecossistema original, como cobertura do solo, alimento e abrigo para animais (RESENDE, 2012). Em termos globais, as leguminosas adicionam mais N ao solo do que os fertilizantes industriais (GOMIDE, 1986), de forma mais econômica e sustentável. Pode-se inferir

que as leguminosas são verdadeiras biofábricas consumidoras de energia limpa e renovável.

Por todos os motivos citados, nos dias atuais, não se pode deixar de lado a possibilidade concreta do cultivo de leguminosas arbóreas para utilização de sua biomassa com várias finalidades, com ênfase na recuperação da matéria orgânica do solo e a manutenção de sua fertilidade.

2.6 *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret

Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), arvoreta ricamente aculeada, dotada de copa irregular, cujos ramos novos apresentam pêlos viscosos. Típica das áreas Semiáridas do Brasil, a jurema preta pertence à família *Mimosaceae* (CRONQUIST, 1981). É uma arvoreta de 5 a 7 m de altura, de porte arbustivo, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante, desprendendo-se em porções delgadas escamiformes e ramos castanho-avermelhados, esparsamente aculeados. Apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa. Dotadas de folhas compostas, bipinadas, de 1 a 3 cm de comprimento (pecíolo e raque) e com 4 a 7 pares de pinas constituídas, com 15 a 33 pares de folíolos brilhantes, que caem e se refazem continuamente, cobrindo o solo com um leve manto que logo se decompõe, formando ligeiras camadas de húmus (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

É típica das áreas semiáridas dos estados do Nordeste do Brasil (Piauí até a Bahia), e no México. A jurema preta possui grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos, é uma espécie indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e sua tendência ao longo do processo é de redução da densidade. No início da sucessão formam matas quase puras, cobrindo o solo com uma tênue camada que se decompõe formando ligeiras camadas de húmus e participa também da recuperação do teor de nitrogênio do solo. Preparando, dessa forma, o solo para o aparecimento de outras plantas mais exigentes (MAIA, 2004). Outra importante atribuição da *Mimosa tenuiflora* está na fixação de nitrogênio a partir da simbiose com microrganismos diazotróficos.

Em seu habitat natural, a jurema-preta tem sido explorada para produção de estacas e lenha, segundo Faria (1984), seu caule é excelente fornecedor de madeira, especialmente para a geração de calor, pois dela se conseguem temperaturas mais

elevadas. Além da utilização pelos caprinos, ovinos e bovinos que têm nessa planta, verde ou fenada, um importante componente de suas dietas, especialmente pastejando as rebrotas mais jovens no início das chuvas, bem como as folhas e vagens secas durante o período de estiagem (PEREIRA FILHO *et al.*, 2005), podendo ser usada também como banco de proteína (FREITAS *et al.*, 2010). Essas características é o que lhe confere importante papel entre as leguminosas da Caatinga.

Devido à sua importância como forrageira no semiárido do Nordeste brasileiro, estudos sobre a *Mimosa tenuiflora* têm sido mais direcionados para seu valor nutricional, bem como, ao seu caráter tóxico, fatores que interferem diretamente na produtividade animal.

A jurema preta é uma das espécies mais utilizadas para obtenção de forragem na pecuária extensiva. É possível obter anualmente mais de 1500 kg de MS/ha, provenientes da coleta das folhas e ramos finos de jurema preta (PEREIRA FILHO *et al.*, 1999). Os frutos da jurema preta também podem constituir uma fonte de alimento para os animais. Estimativas indicam um potencial de produção anual de frutos entre 3000 e 4000 kg/ha (94,4% de MS), dos quais aproximadamente a metade é constituída de sementes, as quais apresentam, na base da matéria seca, 29% de proteína bruta (PB), sendo 54,24% digeríveis pelos animais. Sendo uma importante forrageira para caprinos nos períodos secos do Cariri paraibano, participando com 22,4% da dieta de animais fistulados (LEITE & VIANA, 1986).

Com relação à composição química, Vasconcelos (1997), citado por Pereira Filho *et al.* (2003), trabalhando com feno de jurema-preta obtido no período chuvoso (março e abril) e de estiagem (setembro e outubro), verificou para matéria seca (MS) teores de 90,0 e 90,9%; proteína bruta (PB) de 15,1 e 13,5%; fibra em detergente neutro (FDN) de 35,1 e 36,2%; fibra em detergente ácido (FDA) de 16,0 e 15,7%; e tanino de 26,6 e 16,9%, respectivamente. Em trabalho realizado em Pernambuco com três espécies de pastagens arbustivas e arbóreas da Caatinga, dentre elas a jurema preta, Almeida *et al.* (2006) encontraram valores médios para MS, PB, FDN e FDA das folhas de jurema preta colhidas no período seco de 47,62; 14,82; 46,38; 33,04% respectivamente e, no período chuvoso de 47,52; 14,41; 46,33; 32,36% quando avaliaram espécies arbóreas e arbustivas de pastagens, comparando seus valores nutricionais na época seca e chuvosa.

Apesar das limitações da qualidade da jurema preta, como forrageira, e devido à escassez de material forrageiro de boa qualidade durante a maior parte do ano na região

Semiárida, é interessante que se consiga uma maneira de melhorar a qualidade do volumoso que se apresenta abundante nas copas dessa espécie, como, por exemplo, tratando-se essa forragem com Polietilenoglicol (PEG) (BEELEN *et al.*, 2003) ou NaOH (PEREIRA FILHO *et al.*, 2003). A ingestão de forragem de jurema preta tratada com essas substâncias aumenta significativamente, pois parte dos taninos é neutralizada e a sua degradabilidade aumenta, uma vez que os constituintes da parede celular são quimicamente atacados, facilitando a digestão da celulose e lignina.

Outra forma de diversificar a renda do trabalhador rural utilizando a *Mimosa tenuiflora* seria utilizar potencial tanífero, na curtição de peles. De acordo com Paes *et al.* (2006), analisando a viabilidade técnica de taninos em espécies de ocorrência no Semiárido brasileiro, encontraram na jurema preta teores de taninos condensados superiores ao *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho), tradicionalmente indústria de curtumes, as peles curtidas com os taninos extraídos de jurema preta apresentaram o melhor resultado em relação às espécies avaliadas para o teste de resistência à tração, na direção paralela às fibras.

2.7 Caracterização dos municípios pernambucanos de Arcoverde, São Bento do Una e Sertânia

Com 98.311 km², Pernambuco é um dos 26 estados brasileiros (Figura). Localizado no centro leste da Região Nordeste, tem sua costa banhada pelo Oceano Atlântico. O estado faz limite com a Paraíba, Ceará, Alagoas, Bahia e Piauí. É constituído por 185 municípios e um arquipélago, dentre eles, encontram-se os municípios de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una (IBGE, 2012).



Figura 3. Mapa do estado de Pernambuco, com destaque para os municípios de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una.

A vegetação da Caatinga localiza-se na maior das zonas fitogeográficas pernambucanas. É caracterizada por possuir árvores de porte médio, folhas decíduas, rica em espinhos, na qual se interpoem as cactáceas e bromeliáceas. O clima é seco com a maioria dos solos rasos (LIMA, 2007). Fatores variados de solo, pluviosidade e altitude constituem de modo apreciável o aspecto da Caatinga.

2.7.1 Sertânia

O município de Sertânia está localizado na mesorregião do Sertão, mais precisamente na microrregião Sertão do Moxotó, porção norte do Estado de Pernambuco, limitando-se geograficamente, ao norte, com os municípios de Igaraci e Estado da Paraíba, ao sul, com Ibimirim, Arcoverde, Tupanatinga e Buíque, a leste com o Estado da Paraíba e, a oeste, com Custódia. A área municipal ocupa 2421,527 km², constituindo cerca de 2,38% de participação da área do estado de Pernambuco. O município de Sertânia está totalmente inserido na bacia hidrográfica do rio Moxotó, tendo relevo que varia de plano a suave-ondulado e vegetação predominante do tipo caatinga hiperxerófila.

O clima do município de Sertânia, segundo a classificação de Koeppen é classificado como semiárido quente (IBGE, 2010). A taxa pluviométrica anual no município é da ordem de 635 mm, com período de 7 meses secos, sendo que os maiores valores anuais de pluviometria ocorrem nos meses de março e abril, enquanto que a temperatura média anual é da ordem de 25°C. De acordo com o mapa exploratório-reconhecimento de solos do Estado do Pernambuco os solos predominantes no município são os Luvisolos ocupando 45% da área do município e os Planossolos com 35%. Com menores áreas aparecem os tipos Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA-2,5%), Neossolos Regolíticos (RS-2%), Neossolos Aluviais (SA-0,5%) e Neossolos Litólicos (SL-1,5%) (EMBRAPA, 2013)

2.7.2 Arcoverde

O município de Arcoverde está localizado na mesorregião Sertão e na Microrregião Sertão do Moxotó do Estado de Pernambuco. Com cerca de 350.901 km², representando 0.38 % do Estado de Pernambuco, esse município faz divisa a norte com Estado da Paraíba, a sul com Buíque e Pedra, a leste com Pesqueira, e a oeste com Sertania (IBGE, 2010). O município está inserido na unidade geoambiental do Planalto da Borborema, formada por maciços e outeiros altos, com altitude variando entre 650 a 1.000 metros.

A vegetação tem porte mais alto e adensada, denominada de Caatinga de Cipó. O clima semiárido e temperatura média anual de 23,75°C o período chuvoso concentram-se de fevereiro a julho (IBGE, 2010). A área da unidade é recortada por rios perenes, porém de pequena vazão e o potencial de água subterrânea é baixo.

O relevo é geralmente movimentado, com vales profundos e estreitos dissecados. Com respeito à fertilidade dos solos é bastante variada, com certa predominância de média para alta. Os tipos de solo presentes na região são os Planossolos, medianamente profundos, fortemente drenados, ácidos a moderadamente ácidos e fertilidade natural média, os Argissolos, que são profundos, textura argilosa, e fertilidade natural média a alta, os solos Neossolos, rasos, textura argilosa e fertilidade natural média. Ocorrem ainda afloramentos de rochas.

2.8.3 São Bento do Una

O município de São Bento do Una está localizado na mesorregião Agreste e na Microrregião Vale do Ipojuca, com seu território de 719,147 km², representa 0,72 % do Estado de Pernambuco, com altitude variando entre 650 a 1.000 metros. O município faz divisa a norte com Belo Jardim, a sul com Jucati, Jupi e Lajedo, a leste com Cachoeirinha, e a oeste com Capoeiras, Sanharó e Pesqueira. (IBGE, 2010)

A vegetação é comumente mais densa que a do sertão, o solo geralmente mais profundo e a pluviosidade mais regular e elevada, próprias das áreas agrestes. Porém apenas algumas serras e brejos conservam um pouco da vegetação natural da Caatinga.

Os solos predominantes na área são: Planossolos, Neossolos e Luvisolos (EMBRAPA, 2013). Com respeito à fertilidade dos solos é bastante variada, com certa predominância de média para alta.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, A. W. *et al.* Manejo da cobertura do solo e de práticas conservacionistas nas perdas de solo e água em Sumé, PB. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 06, n. 01, p. 136-141, 2002.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum:Animal Sciences**. v. 28, n. 1, p. 1- 9, 2006.
- ANDRADE, C. M. S. *et al.* Desempenho de Seis Gramíneas Solteiras ou Consorciadas com o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e Eucalipto em Sistema Silvipastoril. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1845-1850, 2003
- ARAGÃO, W. M.; MARTINS, P. S. *Jureminha (Desmanthus virgatusL.): uma leguminosa forrageira promissora*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.40, 1996. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 5).
- ARAÚJO, G. G. L. *et al.* Valor nutritivo e o consumo de nutrientes do feno de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) por caprinos e ovinos. In: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 40., 2003, Santa Maria. Anais... Santa Maria: SBZ, 2003. 1 CD-ROM.
- ARAÚJO FILHO, J.A.; LEITE, E.R.; MESQUITA, R.C. *Dieta e desempenho de caprinos em bancos de proteína na região de Sobral, Ceará*. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p.14, 1990 (EMBRAPACNPC. Boletim de Pesquisa, 15).
- ARAÚJO FILHO, J. A.; CRISPIM, S. M. A. *Pastoreio combinado de bovinos, caprinos e ovinos em áreas de Caatinga no Nordeste do Brasil*. In: conferência virtual global sobre produção orgânica de bovinos de corte, 1., 2002, Corumbá. Anais... Corumbá: Embrapa Pantanal; Concórdia: Universidade de Contestado, 2002.
- ARAÚJO FILHO, J. A. *et al.* *Pastoreio múltiplo em caatinga manipulada no sertão Cearense. Desempenho dos bovinos*. In: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 37., 2000, Viçosa-MG. Anais... Viçosa-MG: SBZ, v.1 p. 110, 2000.
- ARAÚJO FILHO, J. A. *et al.* Sistema agrossilvipastoril Embrapa Caprinos. In: LIMA, G. F. da C. *et al.* (Orgs.). *Criação familiar de caprinos e ovinos no Rio Grande do Norte: orientações para viabilidade do negócio rural*. Natal: EMATER-RN: EMPARN: Embrapa Caprinos, Cap.6, p.121-143, 2006.
- BARCELOS, A. O.; VILELA, L. Leguminosas forrageiras tropicais: estado da arte e perspectivas futuras. In: Cecato, U.; Santos, G.T.; Prado, I.N.; Moreira, I. (eds.). simpósio internacional de forragicultura - reunião da sociedade brasileira de zootecnia, 31, Maringá, 1994. *Anais...* Maringá: EDUEM/SBZ, p.1-56, 1994.
- BARCELLOS, O. A. *et al.* 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, p.51-67, 2008.

BEELEN, P. M. G. et al. *Influência dos taninos condensados sobre a degradabilidade ruminal de jurema preta (Mimosa hostilis), sabiá (Mimosa caesalpiniiifolia) e mororó (Bauhinia cheilantha)*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, XL Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p. 1-3. 2003.

BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotecnology**, v. 22, p.381-393, 1999.

CARVALHO, J. L. N. et al. *Adequação dos sistemas de produção rumo à sustentabilidade ambiental*. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. (Ed.). Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 671-692, 2008.

CARVALHO, M. M.; XAVIER, D. F.; ALVIM, M. J. Arborização melhora a fertilidade do solo em pastagens cultivadas. Comunicado Técnico. Embrapa Gado de Leite. v. 29, p.4, 2003.

CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plant. **Trends in plant science**, v.3, n.10, p. 389-395, 1998.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plant. New York: Columbia University, 1981.

EMPRESA BRASILEIRA PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, ed. 2, p.1-286, 2013.

FARIA, S. M. et al. New nodulating legume trees from southeast Brazil. **New Phytologist**, 98: p. 317-328, 1984.

FARIA, S. M. et al. Ocurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, v.111, p.607-619, 1989.

FAVARETTO, N. et al. Efeito da revegetação e da adubação de área degradada na fertilidade do solo e nas características da palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 35, p.289-297, 2000.

FERGUSON, B. J.; MATHESIOUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 1, p. 47-72, 2003.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica de nitrogênio como fonte de nitrogênio. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. Processos biológicos no sistema solo-planta. Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 201–220, 2005.

FRANCO A. A.; NEVES, M. C. P. Fatores limitantes a fixação biológica de nitrogênio. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tai, S. M.; Neves, M. C. P. ed. Microbiologia do Solo. Campinas. SBCE, p. 219-230, 1992.

FRANCO, A.A., SOUTO, SM. Contribuição da fixação biológica de N₂ na adubação verde. In: FUNDAÇÃO CARGILL. **Adubação verde no Brasil**, p. 199-215, 1984.

FREITAS, A. D. S. et al. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v.74, p.344-349, 2010.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B. Fixação biológica do N₂ em leguminosas arbóreas da Paraíba e de Pernambuco. In: MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. (Eds.) Fertilidade do solo e produção de biomassa no semi-árido. Recife: Editora UFPE, p.27-46, 2008.

GARCEZ, B. S. et al. Leguminosas tropicais como suplemento alimentar para cabras em lactação. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n.03, p. 3494-3499, 2014

GARCIA, R. Manejo de campos naturais. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 4, 1977, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ. p. 127, 1977.

GOMIDE, D. N. Leguminosas: espécies disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para o manejo da consorciação. In: Congresso Brasileiro de Pastagens ; Simpósio sobre Manejo de Pastagem, 8., Anais... Piracicaba, SP. FAEALQ. p. 389-411, 1986.

GUIMARÃES FILHO, C.; MOREIRA, J. N.; NOGUEIRA, D. M. Uma proposta para produção de um cabrito ecológico da caatinga com certificação de denominação de origem: o cabrito do vale do São Francisco. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS, 1., 2006, João Pessoa. Anais... João Pessoa: SEDAP: SEBRAE: INSA, 2006.

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, cap. 2, p. 45-59, 1994.

IBAMA, Disponível em: < via [HTTP://www.ibama.gov.br/ecossistema/caatinga.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistema/caatinga.htm).> Acesso em 03 novembro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Censo Demográfico: 2010. IBGE, 2012.

LEITE, E. R.; VIANA, J. J. Avaliação do potencial forrageiro nos Cariris paraibanos. In: XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campo Grande. Anais... Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p.229, 1986.

LEWIS, G. P. et al. Leguminosae or Fabaceae: legumes of the world. Kew: Royal Botanic Gardens, ed.10, p.578, 2005.

LIMA, D.A. Estudos fitogeográficos de Pernambuco. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v.4, p.243-274, 2007.

- LIMA, D. J. et al. Arranjo espacial, densidade e época de semeadura no acúmulo de matéria seca e nutrientes de três adubos verdes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 531-540, 2010.
- LUGAO, S.M.B. et al. de. Acumulo de forragem e eficiência de utilização do nitrogênio em pastagens de *Panicum maximum* Jacq. adubadas com nitrogênio. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.25, p.371-379, 2003.
- KEYSER, H. H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B.B. Rizobial Ecology and Technology. In: Metting Jr. F.B. (ed.) Soil Microbial Ecology, New York: Dekker, p. 205-206, 1997.
- MAIA, G. N. Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.
- MALAVOLTA, E. et al. *Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações*, ed. 2, p. 319, 1997.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6; p.1005-1010, 1997.
- MEDEIROS, E. V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n.3, p. 529-535, 2009.
- MINSON, D.J. Forage in ruminant nutrition. New York:Academic Press, p.483, 1990.
- MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Monitoramento dos biomas brasileiros: Bioma Caatinga. Brasília: MMA. p.12, 2010.
- MONTENEGRO, J.; ABARCA, S. Fijación de carbono, emisión de metano y óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En. Intensificación de la ganadería em Centroamérica - beneficios economicos y ambientales. CATIE-FAO-SIDE. Editado por Nuetra Terra, p.334, 2000.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M.F.; FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist.**, v. 121, p. 563-570, 1992.
- MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: Araújo, M. R. S.; Hungria, M. Microorganismos de importância agrícola. Brasília: EMBRAPA, p.121-150, 1994.
- NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A. Fixação biológica do nitrogênio na recuperação de áreas degradadas e na produtividade de solos tropicais. **Informe Agropecuário**. v. 24, n. 220, p. 64 – 72, 2003.
- NORTON, B.W.; POPPI, D.P. Composition and nutritional attributes of pasture legumes. In: D'MELLO, J.P.F.; DEVENDRA, C. (Eds). Tropical legumes in animal nutrition. Wallingford: CAB International, p.23-48, 1995.

OLIVEIRA, I.P.; CARVALHO, A.M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. O caupi no Brasil. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, p. 60-96, 1998.

OLIVEIRA, F. L. et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e decomposição de leguminosas utilizadas para adubação verde. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.4, p.503-508, 2010.

OLIVEIRA, M. R. et al. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.14, p. 93-104, 1999.

OLIVEIRA, O. C. Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de pastagens de *Brachiaria* spp. no cerrado brasileiro. (Tese de doutorado) Seropédica, UFRRJ, p.230, 2000.

OLIVEIRA, F. L. et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e decomposição de leguminosas utilizadas para adubação verde. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.4, p.503-508, 2010.

PÁDUA, F.T. ; ALMEIDA, J.C.C, SILVA, T.O. et al. Produção de matéria seca e composição químico-bromatológica do feno de três leguminosas forrageiras tropicais em dois sistemas de cultivo. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1253-1257, 2006.

PAULO, P. F. M. Caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbios em leguminosas forrageiras do Semiárido paraibano. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba- CCA, Areia, p. 88, 2012.

PEREIRA FILHO, J. M. et al. Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*, Wild). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32 n. 1. p.70-76. 2003.

PEREIRA FILHO J. M. et al. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**. v. 17, n. 91, 2005.

PERIN, A. et al. Efeito da cobertura viva com leguminosas herbáceas perenes na agregação de um Argissolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, n.713-720, 2002.

PRADO, R.M. Manual de nutrição de plantas forrageiras. Disponível em: http://www.nutricaoodeplantas.org.br/site/downloads/sumula_livro_nutricaooforrageira.pdf f. acessado em 22 de setembro de 2014.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana: UEFS, 467 p. 2009.

RESENDE, A. S. Recuperação de áreas degradadas na Caatinga. <http://hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2012/recuperacao-de-areas-degradadas-na-caatinga>. Acesso: 13 de Novembro de 2014.

SÁ, I.B. de; ANGELOTTI, F. Degradação ambiental e desertificação no semi-árido brasileiro. In: Mudanças Climáticas e Desertificação no Semi-Árido Brasileiro. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido; Campinas, SP: Embrapa Informática Agropecuária, p.53-76, 2009.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A. & MEDINA, A. (ed.) Seasonally dry tropical forests. New York: Cambridge University Press, p. 35-36, 1995.

SAMPAIO, E. V. S. B. et al. Vegetação e flora da caatinga. Recife: APNE: CNIP, p.176, 2002.

SAMPAIO, E.V.S.B. ; MENEZES, R.S.C. Perspectivas de uso do solo no semi-árido nordestino. In: ARAÚJO, Q.R. (ED.) 500 anos de uso do solo no Brasil. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.339-363, 2002.

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful Woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 72, p. 652–663, 2008.

SANTOS, C. E. R. S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, n. 4, p. 249-256, 2007.

SEGANFREDO, M. A. Leguminosas de verão: capacidade para fixação simbiótica de nitrogênio e potencial de utilização no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.481-487, 1995.

SCHUNKE, R. In: <http://www.cnpqg.embrapa.br/Fertbio2004.pdf>. Acesso: 13 de Novembro de 2014.

SILVA, V. N. et al. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Science Agronomy**, v. 29, p. 331-338, 2007.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agronômico, p. 12-16, 2007.

SOUZA, L. A. G.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação em cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.24, p. 9-18, 1994.

STAMFORD, N. P. et al. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.20, p. 49-54, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, ed. 3, p. 722, 2004.

TARRÉ, R. et al. The effect of the presence of legume on a *Brachiaria humidicola* pasture. **Plant and Soil**, v. 234, p. 15-26, 2001.

TEIXEIRA, F.C.P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N.G. et al. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the ¹⁵N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1989-1993, 2006.

TEODORO, R. B. et al. Leguminosas herbáceas perenes para utilização como coberturas permanentes de solo na Caatinga Mineira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 292-300, 2011.

VALADARES FILHO, S.C., MAGALHÃES, K.A., ROCHA JUNIOR, V.R., CAPELLE, E.R. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. *Biologia dos solos dos cerrado*. Planaltina: EMBRAPA CPAC. p. 524, 1997.

VASCONCELOS, V. R. Caracterização química e degradação de forrageiras do semi-árido brasileiro no rumem de caprinos. 1997. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

XAVIER, G. R. et al. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, p.386-392, 1998.

WILSON, J. R.; MINSON, D. J. Prospects for improving the digestibility and intake of tropical grasses. **Tropical Grasslands**, v. 14, n. 3, p. 253-259, 1980.

Capítulo II

Caracterização cultural de isolados de rizóbios obtidos de nódulos de *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir) em solos do Semiárido pernambucano

Caracterização cultural de isolados de rizóbios obtidos de *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir) em solos do Semiárido pernambucano

RESUMO:

A simbiose estabelecida entre rizóbio nativos e leguminosas forrageiras, essenciais à fixação biológica de nitrogênio (FBN), é fundamental à ciclagem de nutrientes, constituindo alternativa viável para sistemas agropecuários no Semiárido. Esses estudos podem promover o conhecimento ecológico e taxonômico de rizóbios de regiões Semiáridas, bem como gerar informação sobre a funcionalidade dessas bactérias em ambientes Semiáridos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi realizar o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios de isolados provenientes de nódulos da espécie forrageira *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir), cultivada em diferentes solos da região Semiárido do Estado Pernambucano. As amostras de solo para cultivo das plantas em casa de vegetação foram coletadas nos municípios de Sertânia, São Bento do Una e Arcoverde. Os 216 nódulos foram coletados, isolados e repicados em meio LMA e procedeu à caracterização cultural dos isolados, sendo observado em cada um dos isolados características das colônias: Tempo de crescimento para a visualização das colônias, forma e diâmetro das colônias, produção de goma, coloração das colônias e alteração do pH do meio. Os dados foram submetidos à análise de agrupamento para observação de similaridade. Os isolados provenientes de nódulos fixados em raízes de *Mimosa tenuiflora* ocorrência natural nos solos das áreas dos municípios pernambucanos têm crescimento rápido e em sua maioria não modificaram o pH do meio de cultivo, característica normalmente encontra no gênero *Burkholderia* que predomina a colonização da *Minosa tenuiflora*. Os isolados de Arcoverde e São Bento do Una produzem maior quantidade de exopolissacarídeos (muco) do que os de Sertânia. A partir do coeficiente de Jaccard os isolados foram agrupados em 31 grupos distintos mostrando uma elevada diversidade morfológica.

Palavras-chave: caatinga, fixação biológica de nitrogênio, jurema preta

Cultural characterization of rhizobia isolates obtained from *Mimosa tenuiflora* in semiarid soils Pernambuco

ABSTRACT:

The symbiosis established between native rhizobia and forage legumes, essential to biological nitrogen fixation (BNF), is fundamental to the cycling of nutrients, providing viable alternative to agricultural systems in semi-arid. These studies can promote ecological and taxonomic knowledge of rhizobia in semiarid regions, and generate information on the functionality of these bacteria in Semi-Arid environments. The objective of this research was to perform the isolation and evaluation of the cultural diversity of rhizobia isolated from nodules of forage species *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir), grown in different soils of the semiarid region of Pernambuco state region. Soil samples for cultivation of plants in the greenhouse were collected in the municipalities of Sertânia, São Bento and Arcoverde. 216 nodules were collected, isolated and peaked amid LMA and proceeded to cultural characterization of isolates being observed in each of the individual characteristics of the colonies: growth time for viewing the colonies, shape and diameter of the colonies, gum production, coloration of the colonies and change of pH. The data were submitted to cluster analysis to observe similarity. Isolated from nodules set in *Mimosa* roots *tenuiflora* naturally occurring in soils of the areas of pernambucanos municipalities have rapid growth and mostly did not change the pH of the medium, feature normally found in the genus *Burkholderia* predominant colonization of *Minosa tenuiflora*. Isolates of Arcoverde and São Bento produce greater amount of exopolisacarídeos (mucus) than the Sertânia. From the Jaccard coefficient isolates were grouped into 31 distinct groups showing a high morphological diversity.

Keywords: savanna, biological nitrogen fixation, jurema preta

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas representam uma das famílias dominantes na Caatinga, formando um dos principais recursos naturais da flora nativa e importante fonte de alimentação animal no Semiárido. Segundo Araújo *et al.* (2002), as leguminosas ocorrem abundantemente no bioma Caatinga, sendo bem representadas tanto nos estratos arbóreo e arbustivo, como no herbáceo, o que realça sua elevada importância ecológica. Essas espécies são excelentes opções para o suprimento de nitrogênio a ser transformado em proteína, principalmente por ruminantes (SEGANFREDO, 1995).

O Nordeste Brasileiro é um centro de diversificação e distribuição das leguminosas forrageiras, porém, este potencial permanece ainda pouco explorado no setor agropecuário pela falta de conhecimento das espécies que traduza as reais possibilidades de utilização (ARAGÃO & MARTINS, 1996), tais como, a nodulação e contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

A abundância de espécies de leguminosas nessa região pode estar associada diretamente com a microbiota do solo. Essa simbiose pode beneficiar a manutenção da leguminosa em detrimento às demais famílias de plantas, por permitir a fixação biológica do nitrogênio, melhorando a fertilidade do solo rizosférico (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

Apesar da importância potencial da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para as leguminosas forrageiras no Semiárido, poucos estudos tem sido realizados sobre o tema (FREITAS *et al.*, 2011) e as características dos microssimbiontes permanecem pouco estudadas. O cultivo de leguminosas com essa simbiose seria uma alternativa para assegurar alimentação aos animais, principalmente no período seco, já que são espécies mais resistentes aos períodos de estiagem, além do alto valor protéico, capacidade de rebrota, boa digestibilidade melhorando a qualidade da forragem e agressividade na colonização e na formação de banco de proteína.

Dentre as diversas espécies de leguminosas que são bem adaptadas à região Semiárida e que podem se beneficiar da FBN destaca-se a jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), uma árvore de porte arbustivo, com muitos acúleos em seus ramos, adaptada às condições de altas temperaturas e baixa disponibilidade de água, pois floresce e produz sementes durante um longo período do ano, predominando na estação seca (GARIGLIO *et al.*, 2010). É uma espécie com grande capacidade de formar nódulos em

simbiose com rizóbios e fixar nitrogênio, tornando-se uma alternativa para os produtores.

Para o levantamento de informações da diversidade de rizóbios e seleção de estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio, a caracterização fenotípica embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas desconhecidas (WOLDE-MESKEL et al., 2004). O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes, sendo fundamental para a identificação dos organismos, facilitando a classificação taxonômica através da seleção de bactérias mais eficientes e adaptáveis a seu ambiente específico com pH e temperatura favorável ao seu desenvolvimento.

Estes estudos podem promover o conhecimento ecológico e taxonômico de rizóbios de regiões Semiáridas, bem como gerar informação sobre a funcionalidade dessas bactérias nesses ambientes. Assim, o objetivo desta pesquisa foi realizar o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios de isolados provenientes de nódulos da jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), cultivada em diferentes solos da região Semiárida do Estado Pernambucano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Local de estudo

As áreas em estudo compreenderam os municípios pernambucanos de Sertânia, São Bento do Una e Arcoverde. As coletas no campo foram realizadas durante no mês de janeiro de 2014, com a finalidade de analisar os atributos físicos e químicos e realização do ensaio para obtenção de nódulos a partir do cultivo da planta-isca *Mimosa tenuiflora*. A coleta foi realizada após um pequeno pulso de precipitação na região que vinha sofrendo durante dois anos seguidos de estiagem severa.

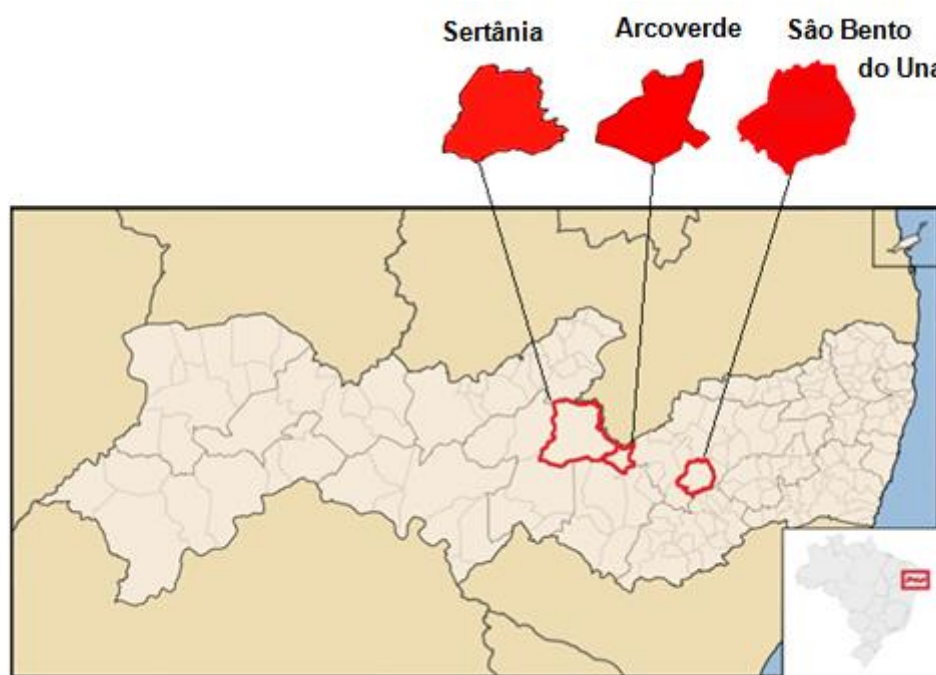


Figura 1. Mapa do estado de Pernambuco, com destaque para os municípios de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una.

Os locais de coleta foram devidamente georreferenciados (Tabela 1) e coletadas amostras de solo em regiões de Sertão (Sertânia), de transição (Arcoverde) e de Agreste (São Bento do Una) do estado de Pernambuco.

As coletas de solo para fins de análise química e física (Tabelas 2) foram realizadas aleatoriamente em pontos representativos das três áreas em estudo (Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una) foi coletada uma amostra de solo com uma pá na camada arável com profundidade de 0 - 20 cm, descartando-se a serrapilheira e próximo ao local onde foi realizada as coletas para cultivo da espécie em estudo. As amostras de

solo de cada cobertura vegetal foram colocadas em sacos plásticos transparentes separadamente, identificadas, armazenadas e transportados para o Laboratório de Análises Físicas e Químicas do CCA/UFPB, onde foram destorroados, homogeneizados e passados em peneiras com malha de 2,0 mm (Terra Fina Seca ao Ar - TFSA).

Tabela 1. Georreferenciamento e descrição das áreas de coleta de solos nos municípios de São Bento do Una, Arcoverde e Sertânia, Pernambuco.

Solo	Localização	Perímetro municipal	Local	Forma de uso e ocupação da Área
1	08°04'27.3" S 37°13'08.7" W	Sertânia- PE	Estação Experimental de Pernambuco (IPA), localizada na microrregião do Moxotó e mesorregião do sertão	Vegetação de caatinga tipicamente hiperxerófila bem preservada com forte presença de cactáceas na fitofisionomia
2	08°03'52.3" S 37°13'39.8" W	Sertânia- PE		
3	08°02'31,2" S 37°13'14.9" W	Sertânia- PE		
4	08°32'14,8" S 36°31'16.2" W	São Bento do Una - PE	Sítio Fazenda Nova, localizada na mesorregião do agreste meridional, microrregião homogênea do Vale do Ipojuca	Caatinga traços característicos de antropização como corte seletivo e predatório de espécies arbóreo-arbustivas
5	08°32'15,5" S 36°31'16.2" W	São Bento do Una - PE		
6	08°32'15,9" S 36°31'16.8" W	São Bento do Una - PE		
7	08°25'58.5" S 37°00'34.3" W	Arco Verde- PE	Serra das Varas, pertencente à Estação Experimental de Pernambuco (IPA), localizada na microrregião do Moxotó e mesorregião do sertão	Vegetação de caatinga em bom estado de preservação caracterizada como Caatinga de Cipó, embora haja forte evidência de antropização como a demarcação com cercas e aberturas ao longo da vegetação
8	08°25'59.3" S 37°00'31.5" W	Arco Verde- PE		
9	08°25'54.8" S 37°00'28.4" W	Arco Verde- PE		

Os atributos físicos e químicos das amostras de solo de cada cobertura vegetal foram determinados de acordo com a metodologia descrita pela Embrapa (1997 e 1999), respectivamente.

Tabela 2. Análise física, química e fertilidade do solo dos municípios de São Bento do Una, Arcoverde e Sertânia, Pernambuco.

Local	Areia				Silte 0,05 - 0,002mm	Argila < 0,002mm	Classe Textural
	Grossa 2 - 0,2mm	Fina 0,2 - 0,05mm					
	-----g/Kg-----						
São B. do Una	379	253			255	113	Franco arenosa
Arcoverde	458	197			199	146	Franco arenosa
Sertânia	404	255			223	118	Franco arenosa

pH H ₂ O (1:2,5)	P	K ⁺	Na ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	SB	CTC	V	m	MO	
	--mg dm ³ --			-----cmol _c /dm ³ -----					-----%----		g/kg		
São B. do Una	5,44	27,1	193	0,058	3,05	1,15	0,05	1,15	4,75	5,91	80,5	1,01	18,17
Arcoverde	5,80	16,3	209	0,041	2,50	1,25	0,00	1,15	4,33	5,48	78,9	0,00	19,11
Sertânia	6,93	28,5	234	0,058	7,10	1,00	0,00	0,16	8,76	8,92	98,2	0,00	26,36

SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de troca catiônica; V = Saturação por bases; m = Saturação por bases; MO = Matéria orgânica.

2.1.2 Obtenção dos nódulos radiculares em *Mimosa tenuiflora*

O procedimento da coleta do solo para cultivo da *Mimosa tenuiflora* em casa de vegetação procedeu-se da seguinte forma: foi escolhido aleatoriamente três pontos distintos em cada área equidistantes no mínimo de 10 m entre si. Em cada ponto foi demarcado, com o auxílio de uma picareta, uma circunferência com raio de aproximadamente 1 m ao redor da *Mimosa tenuiflora* em estudo encontrada no local. O solo rizosférico foi retirado a uma profundidade de 20 cm (Figura 2), em quatro pontos. Após a coleta, os solos foram transportados em caixas térmicas para estufa pertencente ao Laboratório de Análises de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB, onde foram destorroados, homogeneizados e passados em peneiras com malha de 2,0 mm obtenção da TFSA (terra fina seca ao ar).



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 2. Coleta de solo para análise física, química e para o plantio de fabáceas em casa de vegetação.

Para realização do ensaio foram feitas três réplicas de todas as amostras, referente aos três locais de coleta, totalizando 27 vasos (Figura 3A) com capacidade de 1,7 L. Os vasos foram previamente esterilizados através da imersão em água sanitária por 30 minutos, em seguida lavados com água e secos ao ar. Para o plantio da *Mimosa teniflora* foram utilizadas quatro sementes por vaso, previamente desinfetadas com álcool 70% e enxaguadas com água destilada estéril (EMBRAPA, 1997), em seguida imersa em água quente (entre 80 e 90°C), durante 30 segundos, subsequentemente em água na temperatura ambiente por um minuto para a quebra da dormência (BAKKE *et al.*, 2006). Após a emergência das plântulas foi efetuado o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. Na condução do ensaio, foi efetuada irrigação duas vezes ao dia com água destilada conforme necessário. Após 90 dias de cultivo, as plantas foram coletadas, sendo a parte aérea separada das raízes e lavadas com auxílio de uma peneira de 2,0 mm de malha, os nódulos retirados e colocados em tubos hermeticamente fechados contendo algodão e sílica perolada até início das análises para posterior obtenção dos isolados bacterianos (Figura 3B). Foram avaliadas a massa dos nódulos e a matéria seca da parte aérea e da raiz de cada planta.



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 3. Vasos com o plantas de *M. tenuiflora* cultivadas em casa de vegetação (A) Nódulos de *M. tenuiflora*(B).

2.1.3 Isolamentos bacteriano de nódulos da *Mimosa tenuiflora*

Para o isolamento, 10 nódulos coletados foram escolhidos aleatoriamente de cada vaso. Inicialmente os nódulos foram reidratados por 12 horas, tratados com uma solução de álcool etílico a 95% por um minuto, para quebrar a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por dois minutos, para desinfetá-los superficialmente sendo em seguida, lavados por cinco vezes com água destilada estéril (HUNGRIA, 1994). Posteriormente, macerados com bastão de vidro esterilizado, em seguida o material foi inoculado, utilizando-se a técnica de esgotamento de inóculo por estriamento, em placas contendo 15 mL do meio de cultura sólido LMA (“Levedura-Manitol-Agar”) (VINCENT, 1970) com vermelho congo, pH ajustado para 6,8 e incubadas em estufa tipo BOD a 28°C, no escuro e verificadas diariamente até o aparecimento das colônias (Figura 3). Após o crescimento, as bactérias foram repicadas novamente até a obtenção de colônias puras.



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 4. Maceração dos nódulos pertencente a *M. tenuiflora* (A) inoculação pela técnica de esgotamento por estriamento (B).

2.1.4 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

Com as culturas puras as bactérias foram repicadas para placas de petri contendo meio LMA, após o período de incubação procedeu à caracterização morfológica dos isolados, sendo observado em cada um dos isolados características das colônias:

Tempo de crescimento para a visualização das colônias - Foi considerado crescimento muito rápido, para colônias visualizadas após um dia de incubação; rápido, para aquelas visualizadas de dois a três dias de incubação, intermediárias; com quatro a cinco dias; lentas, com seis a dez dias e muito lentas, visualizadas após dez dias de incubação.

- Forma e diâmetro das colônias - O diâmetro das colônias foram classificados como <1 mm, 1 a 2 mm e >2 mm. Quanto à forma, classificadas como circular e irregular.
- Produção de goma - A produção de goma (polissacarídeos) foi determinada juntamente com o diâmetro das colônias, após sete dias de incubação. Esta característica foi determinada visualmente considerando: sem produção de goma (escassa), pouca, moderada e abundante produção de goma.



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 5. Isolados crescidos em placas de petri contendo meio LMA modificado pela adição de solução de Vermelho Congo, com produção de goma abundante.

- Coloração das colônias - A coloração das colônias foi determinada visualmente durante a determinação do diâmetro das colônias, onde foram consideradas as cores: branca, creme, rosa, amarela ou incolor.

Para observar a alteração do pH do meio para isolados de leguminosas pelo aspecto colorimétrico, os isolados de rizóbios foram inoculados em meio LMA

modificado pela adição de 10 mL. L⁻¹ de azul de bromotimol (VINCENT, 1970). Os isolados de rizóbios acidificantes tornam o meio amarelo, os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura variando entre o bege, branco e transparente. Os isolados foram comparados com placas sem inoculação.

As colônias isoladas foram repicadas em erlemeyers contendo meio TY com 15% de glicerol, após crescimento, as bactérias foram armazenadas em microtubos com capacidade de 1mL, identificadas e armazenadas no freezer.

Identificações dos isolados

A partir das caracterizações morfológicas dos isolados, foi construída a matriz binária (presença e ausência da característica) no aplicativo Excel[®] do Office 2003. Essa matriz foi importada para o programa DendroUPGMA de acesso livre, para construção da matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1908; ROHLT, 1997). A partir desta matriz foram construídos os dendrogramas através do mesmo programa, utilizando-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nodulação natural (sem inoculação) na espécie de *Mimosa tenuiflora*, utilizada como planta-isca, ocorreu naturalmente nos três fragmentos de caatinga onde os solos foram coletados e indica a ocorrência de rizóbios compatíveis nas três áreas estudadas. Todas as plantas colhidas, cultivadas em todos os três solos, no momento da colheita apresentavam-se internamente com coloração vermelha, indicando que são nódulos ativos (eficiência na fixação de N), e tamanhos até 3,0 cm de diâmetro (Figura 6). Os nodulos estavam bem distribuídos na base das raízes secundárias, próximo ao colo da planta, confirmando a tendência da subfamília a qual pertence. Quanto à morfologia dos nódulos, os mesmos apresentaram-se indeterminados, conforme descrição de Rothschild (1968). Os nódulos eram compostos de unidades individuais e formação de nódulos siameses, o que parece ser comum a espécie em estudo (ROTSCHILD, 1968 e SPRENT et al., 2007).



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 6. Nódulo segmentado da espécie *Mimosa tenuiflora*

Ao observar a produção de matéria seca na parte aérea da jurema preta pode-se constatar que é a massa dos nódulos influencia diretamente na matéria seca da parte aérea (Figura 7), esta resposta poder estar relacionada à presença destas bactérias que possivelmente induziram melhor crescimento da *Mimosa tenuiflora*, devido ao maior aporte de nitrogênio proveniente dos isolados mais eficientes na fixação do N. A massa dos nódulos é o fator mais indicado na avaliação da nodulação, em virtude de apresentar melhor correlação com o desempenho simbiótico (DÖBEREINER, 1966; HUNGRIA & BOHRER, 2000).

Segundo Araújo *et al.* (2007) o número e a massa dos nódulos são indicativos de nodulação. Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N₂ fixado biologicamente foram relatadas também por Bohrer e Hungria (1998) e

Fernandes *et al.* (2003) e indicam a importância da massa dos nódulos na eficiência da fixação de N₂ em leguminosas. Essas características vêm sendo utilizada na seleção de estirpes para composição de inoculantes (ZILLI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008).

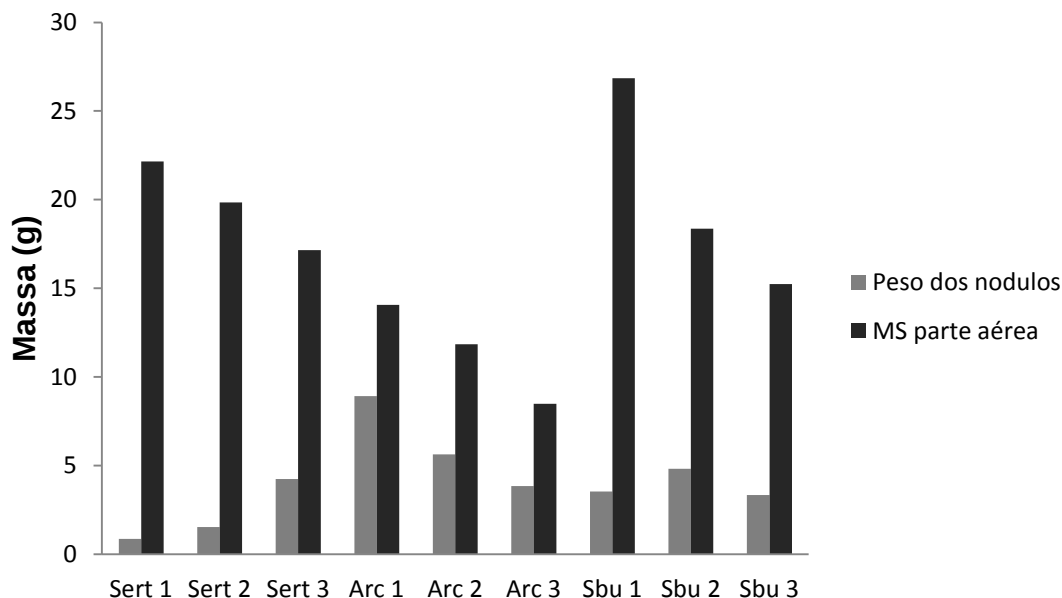


Figura 7. Massa nodular e produção de matéria seca da parte aérea de *Mimosa tenuiflora* aos 90 dias com solos de três regiões Semiárida pernambucanas.

Após o isolamento e purificação das bactérias foram obtidos duzentos e dezesseis bactérias dos nódulos da *M. tenuiflora* nas três áreas em estudo e foram morfológicamente caracterizados. Todos os isolados apresentaram bactérias de crescimento rápido, com aparecimento da colônia entre dois e três dias, característica normalmente encontra no gênero *Burkholderia* que predomina a colonização da *Minosa tenuiflora*. Resultado semelhante foi observado por Oliveira *et al.* (2010), estudando a população nativa de rizóbios do Semiárido Pernambucano onde todos os isolados formaram colônias em até três dias. O crescimento rápido de rizóbios têm sido frequentemente encontrados em regiões áridas e semiárida refletindo uma estratégia de sobrevivência relacionada com aspectos ambientais, onde os microorganismos precisam se multiplicar rapidamente em um curto espaço de tempo umido como sugerido por Martins *et al.* (1997), Freitas *et al.* (2007) e Teixeira *et al.* (2010), que obtiveram resultados semelhantes estudando nódulos radiculares em leguminosas de regiões Semiárida. Assim, à medida que surgem condições ambientais adequadas como umidade e temperatura, tanto o rizóbio quanto a leguminosa apresenta a necessidade de

se estabelecer rapidamente em um curto espaço de tempo úmido para perpetuação da espécie.

Souto *et al.* (2008), estudando a comunidade microbiana em solos de Caatinga observaram a redução na população de bactérias em períodos mais secos e um ligeiro aumento após pulsos de precipitação, que possivelmente pode ter favorecido uma maior disponibilidade de resíduos orgânicos decorrente do aumento na oferta de nutrientes.

Quando comparados a produção de EPS (Exopolissacarídeos) dos isolados em relação ao solo de origem, observa-se que os isolados procedentes a São Bento e Arco Verde apresentaram maior quantidade de EPS que variou de moderado a abundante. Enquanto os de Sertânia 72,1% pouca produção de muco (Figura 8). A maior produção de EPS pelas bactérias nos solos de São Bento do Una e Arcoverde pode ser explicada pelas condições de solo, visto que, essas áreas tem uma maior acidez ativa, quando comparada ao solo de Sertânia que apresentou pH próximo a neutralidade. O que concorda com Batista *et al.* (2007), que observaram tendência a incremento na produção de EPS por isolados cultivados em solos ácidos e sugeriu que seria reflexo da adaptação as condições do solo.

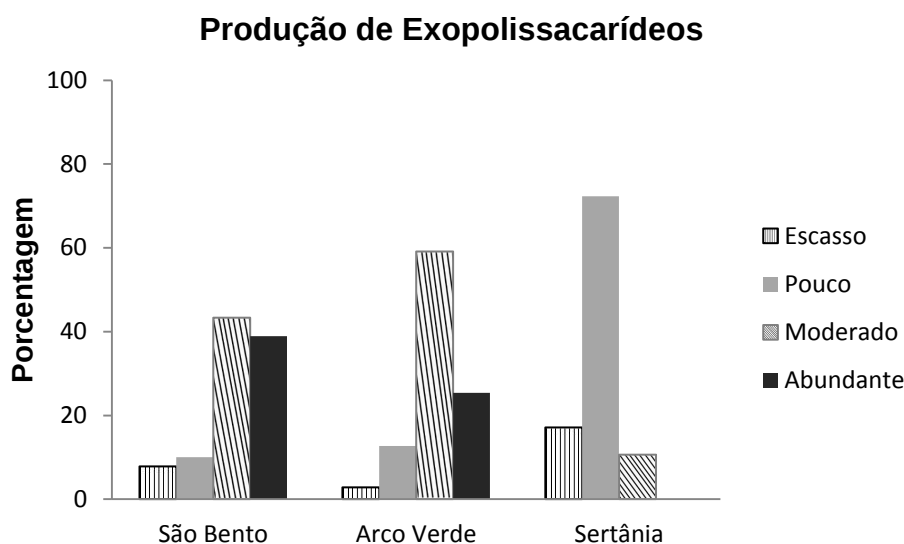


Figura 8. Produção de exopolissacarídeos em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Um dos primeiros estudos a relatar sobre o excesso de exopolissacarídeos na literatura foi apresentado por Sinclair e Eaglesham (1984), onde ficou demonstrada que estirpes que formaram maior quantidade EPS foram mais eficientes em fixar nitrogênio atmosférico, que aquelas que produziam colônias secas sob condições salinas. Outra

característica que tem sido associada ao muco foi observada por Hollingworth *et al.* (1985), ao constatarem maior produção de muco quando as bactérias foram submetidas à temperatura de 42°C do que a 30°C.

Resultados semelhantes também foram observados por Martins *et al.* (1997), com maior tolerância às condições de salinidade e resistência intrínseca a antibióticos de rizóbios isolados de nódulos de *Vigna unguiculata* cultivados em solos do Nordeste. Maior produção de muco foi correlacionada por Xavier *et al.* (1998), à maior tolerância a altos níveis de alumínio. Para Freitas *et al.* (2007), maior produção de muco observada no seu estudo está relacionada à sobrevivência dos isolados em solos salinos de onde foram retirados os isolados.

A quantidade de EPS produzido influencia no diâmetro e na forma dos isolados. Colônias com pouca produção de EPS geralmente apresentam colônias com menores que 1mm de diâmetro e forma circular, o que foi observado com os isolados obtidos de Sertânia (Figura 9). As colônias com produção de EPS moderado a abundante com tamanho maior que 2,0 mm de diâmetro, inicialmente com forma circular, mas aos poucos vai adquirindo forma irregular pela coalescência do muco produzido como observados nos isolados provenientes dos solos de São Bento do Uma e Arcoverde. Resultado semelhante foi encontrado por Teixeira *et al.* (2010) onde que todos os isolados obtidos de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivado em solo de uma área de Caatinga (Petrolina, PE) produziu uma grande quantidade de EPS e isolados com diâmetro de 2,0 mm.

A coloração das colônias variou entre creme, branca e incolor. A cor creme nas colônias foi observada com maior intensidade na espécie, seguida da cor branca, demonstrando que o solo não exerce influência nessa característica. Corroborando com os resultados obtidos por Silva *et al.* (2007), observaram colônias com coloração branco e creme.

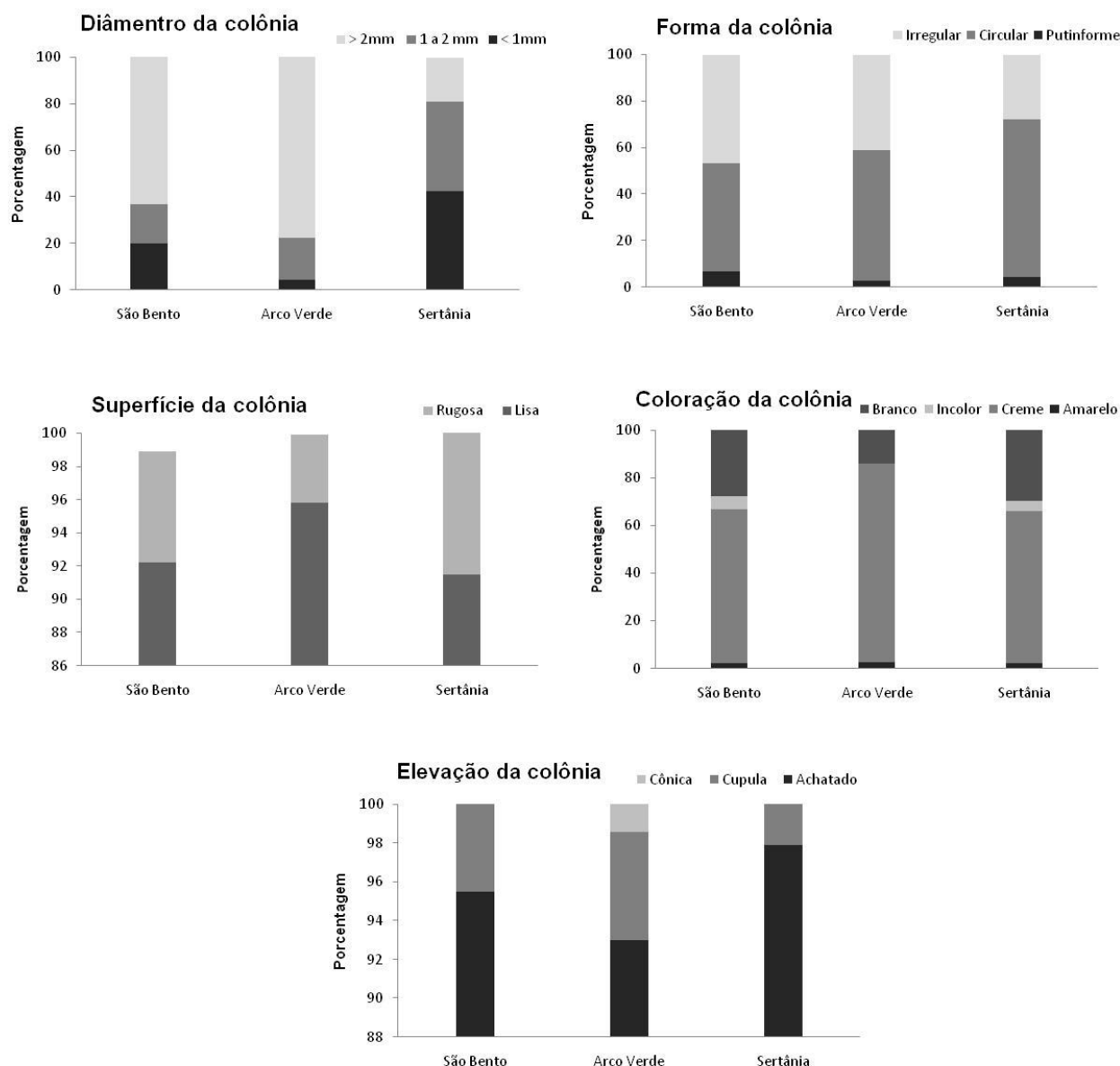


Figura 9. Diâmetro, forma e coloração da colônia em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Colônias brancas, cremosas ou translúcidas são comumente formadas por bactérias associadas com leguminosas arbóreas selvagens, como a *Mimosa tenuiflora* (TEIXEIRA *et al.*, 2010). A cor branca e creme também predominou entre os isolados de *Mimosa tenuiflora* em estudo realizado por Freitas *et al.* (2014). Considerando que as descrições de colônias formadas pelo *Burkholderia* spp associada a *Mimosa* são escassos, sendo difícil avaliar a frequência destes fenótipos (REIS JR *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2014). Quanto à elevação das colônias, em sua maioria apresentaram-se achatadas, discordando de Silva *et al.* (2007), que em seu

estudo ao caracterizarem e selecionarem populações nativas de rizóbios de região Semiárida de Pernambuco observaram em todos isolados com elevação convexa.

O crescimento dos isolados de rizóbio provocaram modificações no pH do meio (Figura 10), podendo acidificá-lo, alcalinizá-lo ou mantê-lo na neutralidade. A maioria dos isolados não alterou o pH do meio (95%), independente da região dos isolados, característica normalmente encontra no gênero *Burkholderia* que predomina a colonização da *Minosa tenuiflora*. Tais resultados corroboram com os dados encontrados por Martins (1996), ao estudar solos do Sertão e da Zona da Mata de Pernambuco, observou ocorrência maior de rizóbios que não alteraram o pH do meio de cultura nos solos do Sertão, em comparação com as áreas da Zona da Mata, com predominância de solos ácidos.

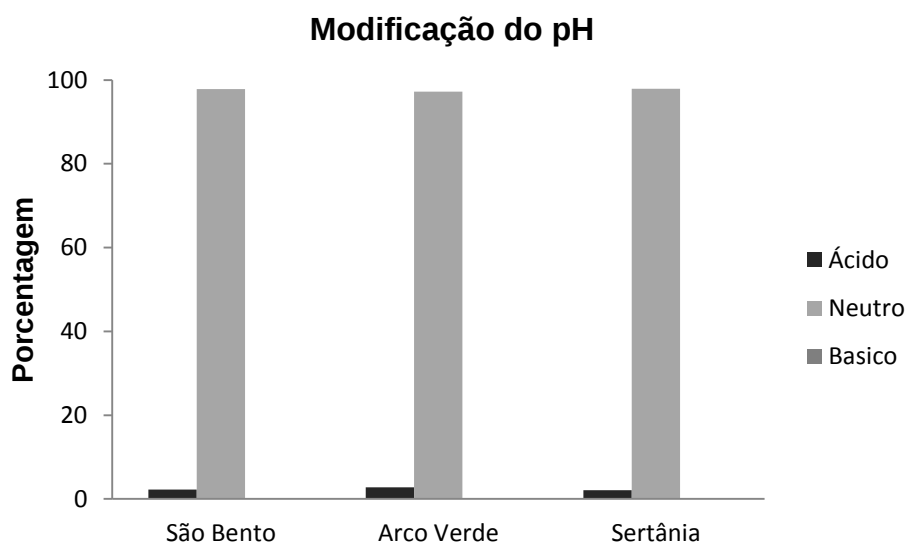


Figura 10. Modificação do pH em meio LMA, obtidos dos nódulos de *Mimosa tenuiflora* da região Semiárida pernambucana.

Freitas *et al.* (2014), estudando *Mimosa tenuiflora* cultivada em solos de Serra Talhada, Santa Terezinha e Remígio também observaram rápido desenvolvimento, mas, alguns deles não modificaram o meio de cultura YMA.

Resultados diferentes foram obtidos por Medeiros *et al.* (2009) e Leite *et al.* (2009), que obtiveram em seus estudos isolados com crescimento rápido e reação ácida do meio de cultura. Teixeira *et al.* (2010), observaram que todos os isolados obtidos de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivado em solo de uma área de Caatinga (Petrolina, Pernambuco, Brasil) tiveram um rápido desenvolvimento e acidificaram o meio.

Com os dados da caracterização cultural, foi elaborado um dendrograma de similaridade entre os isolados, agrupados de acordo com o coeficiente de Jaccard (J). Para tanto, inicialmente eles foram classificados de acordo com as características morfológicas, e foram eliminados da análise os isolados com 100% de similaridade, utilizando apenas um para construção do agrupamento. Isso permitiu a eliminação de múltiplas bifurcações na árvore. Os 216 isolados distribuíram-se em 59 perfis morfológicos distintos, sendo estes agrupados em 33 grupos em nível de 70% de similaridade (Figura 10). Baseado nos resultados apresentados, 14% dos isolados tem similaridade abaixo de 80% evidenciando elevada diversidade morfológica. Apartir dos dados pode-se concluir que pode haver diferentes populações nativas de rizóbios, visto que a grupos são distantes entre si. A diversidade dentro da população de rizóbios poderia oferecer vantagens na sobrevivência e adaptação de nodulação em diferentes ambientes.

Medeiros *et al.* (2009), estudando população nativa de rizóbio do Semiárido do Rio Grande do Norte observaram elevada diversidade morfológica dos isolados encontrados. Torna-se de suma importância a busca de isolados da região onde se deseja cultivar, a fim de selecionar os isolados adaptados às condições ambientais, que invariavelmente são adversas, sejam por questões de temperatura do solo, baixa fertilidade ou salinidade.

Freitas *et al.* (2007), ao caracterizar isolados nativos do semiárido pernambucano, analisando o dendrograma gerado pelos dados fenotípicos das colônias, observaram que a distância entre isolados variou de 56% a 100%, demonstrando uma diversidade bastante elevada.

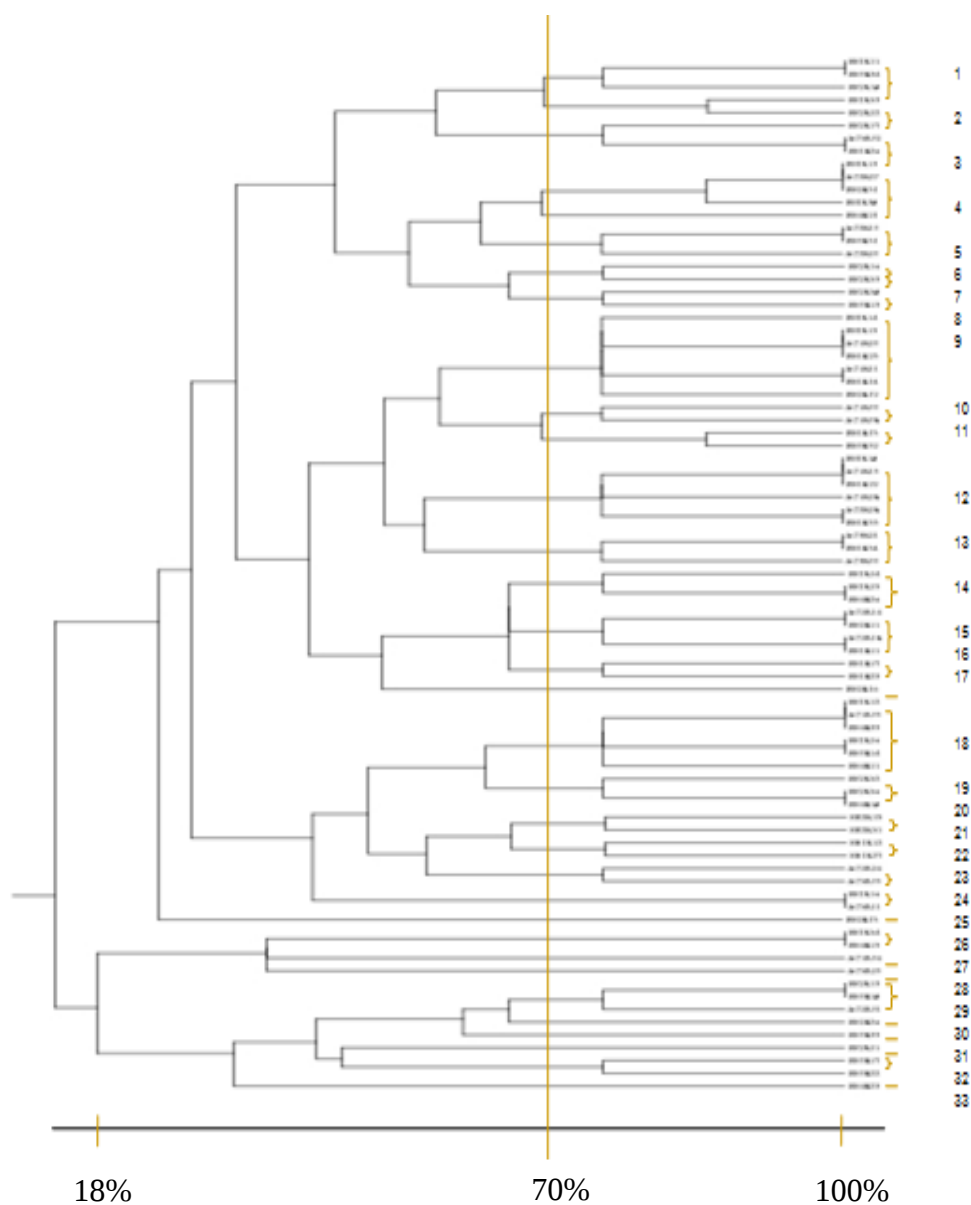


Figura 11. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos isolados obtidos da jurema preta, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

4. CONCLUSÃO

Os isolados de nódulos fixados em raízes de *Mimosa tenuiflora* de ocorrência natural em solos de Arcoverde, Sertânia e São Bento do Una têm característica de crescimento rápido.

Nódulos fixados em raízes de *Mimosa tenuiflora* de ocorrência natural nos solos das áreas dos municípios de Arcoverde e São Bento do Una produzem mais exopolissacarídeos (muco) do que nas de Sertânia

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, F.F. et al. Fixação biológica de N² no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, p. 535-540, 2007.

ARAGÃO, W. M.; MARTINS, P. S. Jureminha (*Desmanthus virgatus* L.): Uma leguminosa forrageira promissora. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 40, 1996. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 5)

BATISTA, J.S.S. et al. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados, **Soil Microbial Ecology**, v.53, p.270–284, 2007.

BAKKE, I. A. et al. Water and Sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret seed germination. **Caatinga**, v. 19, p. 261-267, 2006.

BOHRER, T.R.J. & HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 33, p. 937-952, 1998.

DENDROUPGMA; GARCIA-VALLVÉ, SANTI; PUIGBO, PERE. <http://genomes.urv.es/UPGMA/>. Acesso em 09 de 2014, disponível em D-UPGMA-DendroUPGMA: A dendrogram construction utility; Universitat Rovira i Virgili (URV). Tarragona. Spain.. (2009)

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, n. 210, p. 850-852, 1966.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca*. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, Dez. p. 7, 1997. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 43).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Araujo, R. S.; Hungria, M. Eds. Brasília. Embrapa-SPI. p. 542, 1994.

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**, n. 38, p. 835-842, 2003.

FREITAS, A.D.S et al. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 788-796, 2014.

FREITAS, A. D. S. et al. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

FREITAS, A. D. S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco. **Bragantia**, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

GARIGLIO, M.A. et al. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. **Serviço Florestal Brasileiro**, p.368, 2010.

HUNGRIA, M. & BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, n. 31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Org.). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, DF: EMBRAPASPI, p.45-61, 1994.

HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, v.142, p.18-20, 1985.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bul. Soc. Vaudoise des Sciences Naturelles*, v.44, p.223-270, 1908.

LEITE, J. et al. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.

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

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 & Biochemistry**, v. 5, n. 6, p. 1005-1010, 1996.

MEDEIROS, E. V. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 31, n.3, p. 529-535, 2009.

MELLONI R. et al. 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, p. 235-246, 2006.

REIS JR, F.B. et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosas* pp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol.* v. 186, p. 934-946, 2010.

ROHLF, F. J.NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.0. **Exeter Publications**, 1997.

- SANTOS, L. A.; REIS, V. M. A formação de nódulos em leguminosas. Seropédica. **Embrapa Agrobiologia**, p. 14, 2008. (Documentos/ Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 251).
- SEGANFREDO, M. A. Leguminosas de verão: capacidade para fixação simbiótica de nitrogênio e potencial de utilização no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.481-487, 1995.
- SILVA, V. N. et al. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Science Agronomy**, v. 29, p. 331-338, 2007.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, p.12-16, 2007.
- SINCLAIR, N.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, p.247-251, 1984.
- SOUTO, P.C. et al. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 32, p. 151-160, 2008
- SOUZA, R.A. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 83-91, 2008.
- SPRENT J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, v. 174, p. 11-25, 2007.
- TEIXEIRA F. C. P. et al. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 201-208, 2010.
- VINCENT, J. M. A. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Blackwell Scientific**, p.164,1970.
- WOLDE-MESKEL, E. et al. Nodulation status of native woody legumes and phenotypic characteristics of associated rhizobia in soils of southern Ethiopia. **Biology Fertil Soils**, v. 40, p. 55-66, 2004.
- XAVIER, G. R. et al. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v.27, p.386-392, 1998.
- ZILLI, J.É. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, p. 811-818, 2006.

Capítulo III

Tolerância de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir) a salinidade, temperatura e potencial Hidrogeniônico do meio de cultura.

Tolerância de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir) a salinidade, temperatura e potencial Hidrogênionico.

RESUMO:

O Semiárido apresenta uma cobertura vegetal diversificada, porém sob constante pressão antrópica, o que vem reduzindo significativamente a resistência e a resiliência dos ecossistemas causando maior suscetibilidade do solo à salinidade, comprometendo não apenas as plantas, mas também causando efeitos deletérios à diversidade da comunidade microbiana do solo. Objetivou-se com trabalho foi caracterizar fisiologicamente estirpes de rizóbios nativos que nodulam na espécie forrageiras *Mimosa tenuiflora* (Wild. Poir). As amostras de solo para cultivo das plantas em casa de vegetação foram coletadas nos municípios de Sertânia, São Bento do Una e Arcoverde, Pernambuco. Os rizóbios foram submetidos a testes com relação à tolerância a NaCl, temperatura e pH empregando método de avaliação *in vitro* e estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características fisiológicas a partir do isolamento dos rizóbios de nódulos da *Mimosa tenuiflora*, cultivado em solos do Semiárido pernambucano. Os rizóbios nativos da região semiáridas pernambucanas apresentam resistência a elevadas temperaturas, variação na salinidade e pH. Essas características são influenciadas pela severidade do estresse imposto ao isolado, pelo local e pela espécie botânica em simbiose com os rizóbios. Dentre as áreas estudadas os isolados provenientes da região de Sertânia foram os que mostraram maior tolerância aos estresses ao qual foram submetidos. Os isolados provenientes do solo de Sertânia apresentaram os maior índice de diversidade para Shannon e equitabilidade, menores graus de dominância

Palavras-chave: semiárido brasileiro, caatinga, índice de diversidade

Rhizobia tolerance *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir) salinity, temperature and hydrogen potential.

ABSTRACT:

The semiarid region presents a diverse vegetation cover, but under constant anthropogenic pressure, which comes significantly reduces the resistance and resilience of ecosystems causing greater susceptibility of soil salinity, compromising not only plants, but also causing deleterious effects to the diversity of the microbial community from soil. The objective was to characterize physiologically strains of rhizobia nodulating on forage species *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir). Soil samples for growing plants in a greenhouse were collected in the municipalities of Sertânia, São Bento and Arcoverde, Pernambuco. The strains were tested with respect to tolerance to NaCl, pH and temperature using in vitro evaluation method and estimate the diversity of rhizobia groups through physiological characteristics from the isolation of rhizobia of *Mimosa tenuiflora* nodes, grown in the soil semiarid Pernambuco. Native rhizobia of Pernambuco semi-arid region have high temperature resistance, variation in salinity and pH. These characteristics are influenced by the severity of the stress imposed on the isolated, the local and the botanical species in symbiosis with rhizobia. Among the areas studied isolates from Sertânia region were those who showed greater tolerance to stresses to which they were subjected. Isolated from the Sertânia soil showed the highest diversity index for Shannon and equitability, lesser degrees of dominance

Keywords: Salinity, temperature, rhizobia

1. INTRODUÇÃO

A produtividade e a simbiose rizóbio-leguminosa das Fabáceas em solos das regiões Semiáridas são afetadas por inúmeros fatores, dentre eles incluem as condições físico-químicas do solo, salinidade, pH do solo, extremos de temperatura e umidade (THIES *et al.*, 1995). A salinidade em particular afeta negativamente a sobrevivência e proliferação de estirpes no solo e na rizosfera, além de causar redução no crescimento e desenvolvimento das plantas, especialmente nas glicófitas, em decorrência de distúrbios fisiológicos (FREITAS & RODRIGUES, 2009). O excesso de sais solúveis provoca uma redução do potencial hídrico do solo, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Essa redução, associada com os efeitos tóxicos dos sais, interfere inicialmente no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando também no desenvolvimento normal das plantas e sobre alguns processos biológicos (REBOUÇAS *et al.*, 1989), tais como fotossíntese e demanda de nitrogênio da planta hospedeira.

No entanto, sabe-se que algumas populações de rizóbio variam sua tolerância para esses fatores ambientais (WEI *et al.*, 2008). A busca por estirpes de bactérias diazotróficas simbióticas nativas que apresentam grande variação na tolerância, poderia minimizar esse problema, a obtenção de tais estirpes de bactérias aumentaria o desempenho da simbiose e a produtividade vegetal de forma sustentada nessas condições.

Para tanto, testes *in vitro* podem ser utilizados antes da verificação no campo, pois, além de permitirem a comparação de um grande número de microrganismos, são rápidos e de custo relativamente baixo, possibilitando a identificação de estirpes tolerantes à condição desejada (NÓBREGA *et al.* 2004). Essa seleção é feita com o objetivo de se obter um inoculante competitivo capaz de se estabelecer mais rapidamente no solo e tolerar melhor estresses ambientais como temperatura, salinidade e acidez (SILVA *et al.*, 2002).

Existem poucos estudos sobre o efeito do estresse ambiental sobre os microrganismos do solo, tanto espacial quanto temporalmente ao efeito produzido sobre plantas e animais. Essas diferenças devem ser bem definidas para que se possam formular hipóteses e fazer interpretações corretas sobre os fatores que determinam a diversidade dos microrganismos do solo (COUTINHO *et al.*, 1999; ROSADO *et al.*, 2000).

A diversidade da comunidade microbiana do solo é um indicador determinante do estado de conservação do ecossistema. Para Odum (1988) essa biodiversidade é responsável pela estabilidade e resiliência do ecossistema, haja vista estar ligada, direta ou indiretamente, a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes. Essa diversidade pode ser medida por intermédio de índices matemáticos, são ferramentas poderosas para o estudo da diversidade microbiana que permitem mensurar a diversidade, levando em consideração informações relacionadas à avaliação das características culturais do rizóbio. Neste sentido, a diversidade tem sido citada como um indicador adequado para avaliar a qualidade do solo e a conservação de um ecossistema (OVREAS & TORSVIK, 1998).

Este estudo objetivou-se verificar diferenças entre isolados de bactérias que nodulam *Mimosa tenuiflora*, isoladas de diferentes locais, com relação à tolerância a NaCl, temperatura e pH empregando método de avaliação *in vitro* e estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características fisiológicas a partir do isolamento dos rizóbios de nódulos da *Mimosa tenuiflora*, cultivada em solos do Semiárido pernambucano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os 216 isolados bacterianos provenientes da *Mimosa tenuiflora*, que foram avaliados quanto à diversidade morfológicas em solos do Semiárido pernambucano, descrita no capítulo 1, foram testados em níveis crescentes de cloreto de sódio, pH e temperatura em meio de cultura, com a finalidade de testar a tolerância desses isolados.

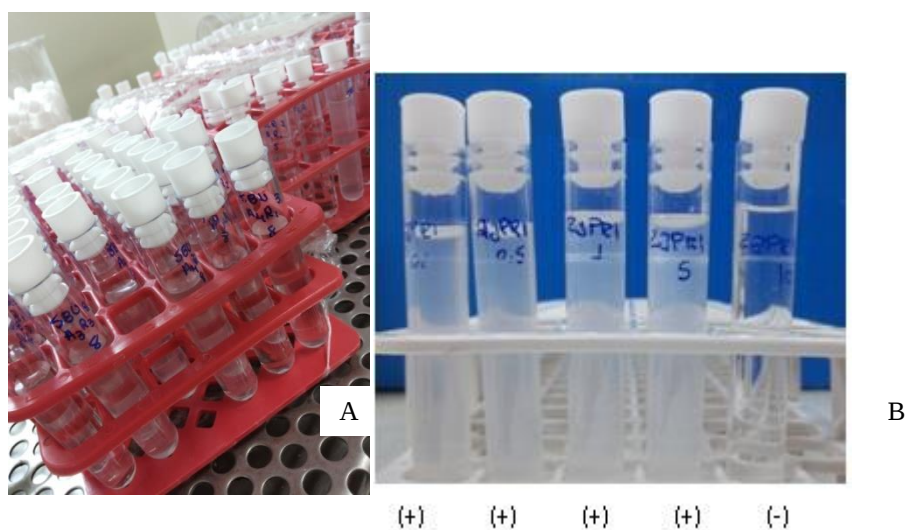
2.1 Caracterização fisiológica de isolados de leguminosas

- Crescimento em diferentes concentrações de NaCl - A habilidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl foi determinada pela incubação dos isolados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LM (VINCENT, 1970), acrescidos com 0,1% (0,27g L⁻¹), 0,5% (1,35g L⁻¹), 1% (2,7g L⁻¹), 5% (13,5g L⁻¹) e 10% (27g L⁻¹) de NaCl solúvel em meio de cultura, incubados a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm durante três dias (Tabela 1).

Tabela 1. Condutividade elétrica do meio de cultura de acordo com os níveis de NaCl aplicados.

Concentrações (%)	Nível de NaCl g. L ⁻¹	Condutividade Elétrica (dS. m ⁻¹)
0,03	0,27	2,77
0,15	1,35	8,32
0,3	2,7	16,76
1,5	13,5	64,70
3	27,0	103,8

Tubos com turbidez no caldo foram considerados com crescimento positivo e não turvos negativos. Duas testemunhas foram utilizadas na comparação, crescidas a pH 6,8 em temperatura de 28°C sob agitação de 120 rpm no mesmo período de tempo. Um tratamento sem inoculação foi utilizado na comparação dos resultados negativos. Os isolados tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).



Fonte: Paulo, P. F. M. (2015)

Figura 1. Incubação dos isolados para testes de tolerância (A); Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a salinidade (B).

- Crescimento em diferentes temperaturas - A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi determinada pela inoculação em tubos de ensaio contendo meio LM (VINCENT, 1970), onde os isolados foram incubados a temperatura de 28; 35

e 40°C. Tubos que apresentaram turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo (+) e não turvos (-), considerados negativos. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento.

- Crescimento em diferentes pH - Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes pH, tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo LM (VINCENT, 1970), com pH previamente ajustados para 4; 5; 6; 7 e 8, utilizando NaOH ou HCl, foram inoculados e crescidos a uma temperatura de 28°C sob agitação orbital de 120 rpm. A análise de crescimento foi determinada três dias após a incubação. Tubos que apresentaram turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo e não turvos considerados negativos (Figura 1). Foram inoculadas duas testemunhas que cresceram em caldo LM (VINCENT, 1970) com pH 6,8 e temperatura de 28°C sob agitação orbital de 120 rpm. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento. Os isolados que foram tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).

Os resultados do agrupamento fisiológico serviram como base para os cálculos da diversidade dos rizóbios nos diferentes solos; para isto, cada grupo fisiológico foi considerado como um OTU segundo (SANTOS *et al.*, 2007). Foi utilizado o índice de diversidade de espécies proposto por Shannon (1948).

Equação:
$$H' = - \sum_{i=1}^n p_i \times \log_b p_i$$

Onde: Onde: p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécimes (isolados) encontrados nos levantamentos realizados.

Equitabilidade de Pielou (1958),

Equação:
$$J = \frac{H'}{H_{max'}}$$

Onde H' é o Índice de Shanon e $H_{max'}$ é dado pela seguinte expressão: $H_{max'} = \log_b n$.

Dominância de Simpsom

Equação:
$$D_s = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n n_i \times (n_i - 1)}{N(N - 1)} \right)$$

Onde: n_i é o número de indivíduos de cada espécie; N é o número de indivíduos.

Riqueza de espécies de Jackknife 1ª Ordem

Equação:
$$E_D = S_{obs} + s_1 \left(\frac{f-1}{f} \right)$$

Onde: S_{obs} = número de OTU observadas; s_1 = o número de espécie que está presente em somente um agrupamento (espécie de um agrupamento) e f = o número de agrupamento que contém a *iésima* espécie de um agrupamento.

Para os cálculos dos índices supracitados foi utilizado o software DivEs - Diversidade de Espécies v. 3.0, (2015).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Avaliando a resistência dos 216 isolados de rizóbios proveniente da *Mimosa tenuiflora* em diferentes temperaturas, observou-se decréscimo do potencial de crescimento quando aumentava a temperatura, para as bactérias oriundas das três regiões estudadas. A temperatura de 28°C o crescimento foi de 100% o que já era esperado, visto que, é a temperatura ideal para crescimento e desenvolvimento dos isolados. Um percentual considerável dos isolados foi capaz de sobreviver quando incubados a temperatura mais elevadas, os isolados provenientes da área de Sertânia apresentaram melhor desempenho com crescimento de 71% dos isolados a temperatura de 40°C, seguido dos isolados de Arcoverde 54% e São Bento do Una com 42% (Figura 2).

Alta temperatura do solo é um dos fatores críticos que podem impedir o desenvolvimento de uma associação fixadora de nitrogênio entre os dois parceiros simbióticos, especialmente quando se trata de regiões áridas e semiáridas (NISTE *et al.*, 2013). A temperatura ideal para crescimento e desenvolvimentos das bactérias fixadoras de nitrogênio varia entre 27° a 35°C e muitos deles são incapazes de crescer a 38 ° C; esta temperatura ótima pode diferir de uma espécie para outra, assim como a temperatura máxima.

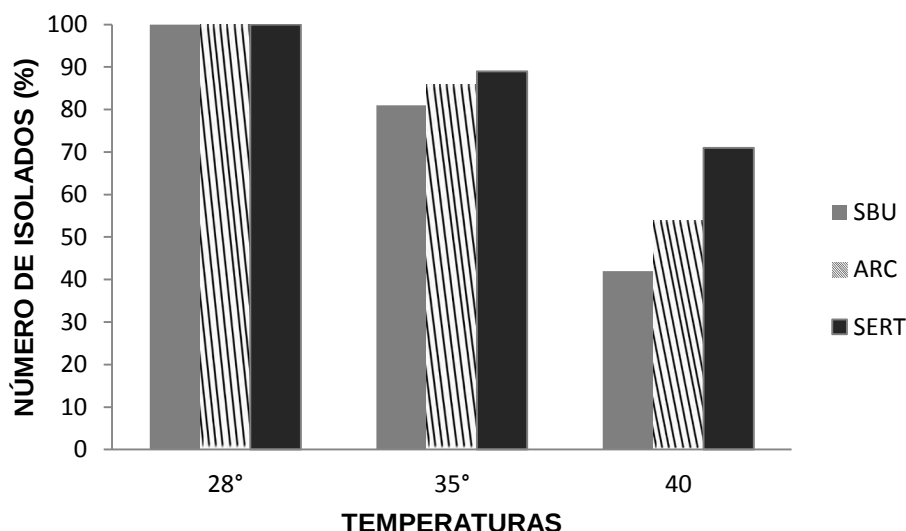


Figura 2. Tolerância a diferentes temperaturas, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

A temperatura pode influenciar não só a sobrevivência de rizóbios de vida livre, mas também a troca de sinais moleculares entre os parceiros simbióticos (SADOWSKY, 2005), que pode ocasionar perda das propriedades de nodulação e fixação de nitrogênio, por induzir um efeito inibidor sobre a aderência bacteriana nos pêlos radiculares, na diferenciação bacterioide, na estrutura e no funcionamento do nódulo (ALEXANDRE & OLIVEIRA, 2013).

Estudos realizados no Nordeste brasileiro demonstram que isolados das regiões mais quentes e secas apresentam capacidade de crescer em temperatura elevadas. Medeiros *et al.* (2007) e Nunes *et al.* (2009), isolando bactérias a partir dos nódulos da região Semiárida do nordeste brasileiro observaram a capacidade de crescimento em temperaturas superiores a 40°C. Bactérias que demonstram resistência a altas temperaturas, a resposta pode estar associada à indução da síntese de proteínas de choque térmico (HSP), que pode desempenhar um papel protetor e contribuem para a tolerância ao aquecimento sem alteração da temperatura interna da célula (YURA *et al.*, 2000). As HSPs fazem parte da grande família das hproteínas conhecidas como chaperonas moleculares, assim chamadas por possuir a capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana (CASTRO *et al.*, 2012). A maioria das bactérias têm apenas um pequeno número de HSP, mas rizóbios parecem apresentar uma exceção (ALEXANDRE &

OLIVEIRA, 2013). Nos rizóbios as chaperonas moleculares DnaK e GroEL são produzidas em elevada escala quando submetidos ao estresse térmico, caracteriza-se por seu papel como moduladores no dobramento de proteínas, entre outras, incluindo o transporte (GOMES *et al.* 2012) e estabilização de uma grande variedade de polipéptidos (ALEXANDRE & OLIVEIRA, 2013).

Outra observação relacionada a estirpes de rizóbios cultivadas em temperaturas elevadas foi demonstrada por Kulkarni e Nautiyal (2000), demonstraram que a morfologia celular de estirpes submetidas a altas temperaturas era diferentes das cultivadas em temperaturas ideais. Essas modificação celulares foram associadas principalmente ao espessamento da parede celular, na tentativa de formar uma barreira à perda de água.

Os rizóbios proveniente de *Mimosa tenuiflora* submetidos ao estresse salino por diferentes concentrações de sódio, na forma de NaCl (cloreto de sódio), provenientes da área de Sertânia apresentaram resistência aos níveis de 0,03 a 0,15% de salinidade (Figura 3), 100% dos isolados obtiveram crescimento positivo, enquanto os isolados oriundos das áreas Arcoverde e São Bento do Una decresceram a medida que os níveis de salinidade aumentaram. A partir de 1,5% a sensibilidade ao sal foi observada uma diminuição da tolerância também para as espécies provenientes de Sertânia, cerca de 21% dos isolados obtidos não desenvolveu crescimento bacteriano.

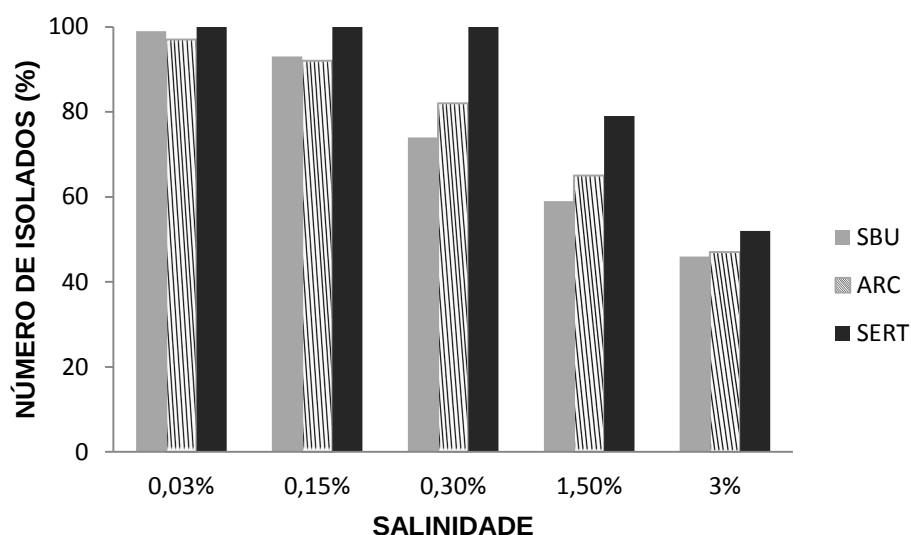


Figura 3. Tolerância a diferentes salinidades, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

O trabalho de Nunes *et al.* (2009), em solos de regiões Semiáridas observaram que aproximadamente 50% dos 76 isolados analisados apresentaram tolerância a 3% de NaCl. Resultados semelhante foram encontrado por Medeiros *et al.* (2007) e Xavier *et al.* (2007), estudando estirpes provenientes de regiões semiáridas, com crescimento positivo ao nível de 3% de salinidade.

Estirpes de rizóbio diferem na sua capacidade de tolerar estresse osmótico e pode usar mecanismos de adaptação diferentes, tais como, a acumulação intracelular de solutos orgânicos (ZAHARAN, 1999), alterações na morfologia celular e tamanho (SHARMA *et al.*, 2013) ou modificações no padrão extracelular de polissacáridos e lipopolissacáridos (VENTORINO *et al.*, 2012). Estes compostos podem ter um impacto sobre simbiose devido à sua implicação nas etapas iniciais das interações simbióticas. Além disso, alguns autores relataram que a tolerância à salinidade pode ser devido a uma resistência mediada pelos plasmídeos já que a resistência de sal pode ser rapidamente transferidos de tolerante a bactérias sensíveis, assim genes cromossômicos adicionais podem contribuir para a sobrevivência em solo salino (PEREIRA *et al.*, 2008). As alterações na expressão dos gene também parece estar entre os mecanismos de adaptação do rizóbios para tolerar o estresse hiperosmótico (LAPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2013)

A maioria das leguminosas necessitam de um solo neutro ou ligeiramente ácido para crescimento, especialmente quando elas dependem de fixação simbiótica de N₂ (ZAHARAN, 1999). Porém estirpes de rizóbio variam muito em sua tolerância à acidez, algumas estirpes de rizóbio pode resistir e sobreviver mesmo em um pH muito baixo (cerca de 3,5), enquanto a alcalinidade é menos nocivo para a sobrevivência do rizóbio (BROCKWELL *et al.*, 2005).

Essa diversidade a tolerância de isolados a diferentes potenciais hidrogeniônico pode ser constatada ao avaliar as regiões em estudo (Figura 4), onde pode-se observa que todos os isolados obtidos em Sertânia cresceram em todos os níveis de pH. Seguindo da Região de Arcoverde onde todos os isolados cresceram na faixa de pH 6 e 7, visto que a faixa ideal para o crescimento do rizóbio varia entre 6,8 e 7 (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Quando submetidos aos demais níveis houve um declínio para 85% na resistência dos isolados nos demais valores de pH. Os isolados provenientes de São Bento do Una apresentaram crescimento 100% positivo para pH 7, o que já era esperado, não cresceram quando submetidos ao pH quatro.

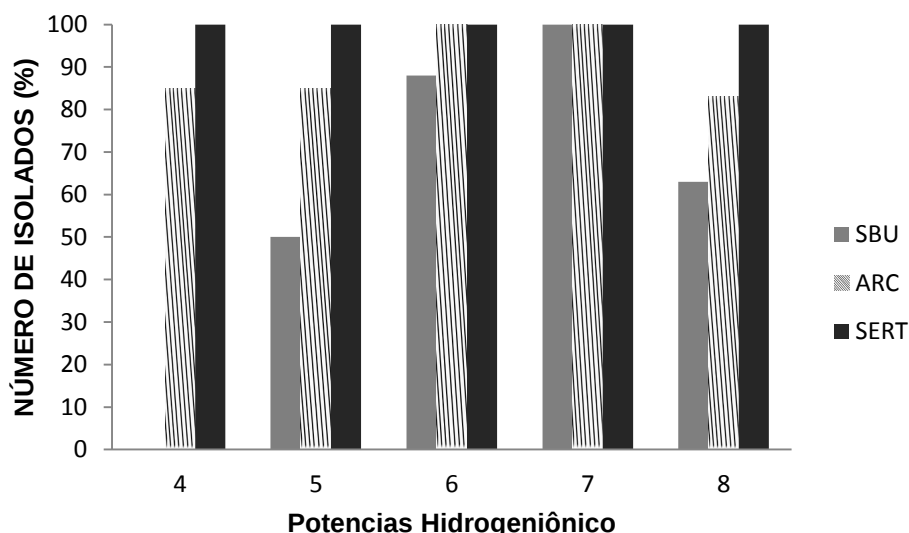


Figura 4. Tolerância a diferentes potenciais hidrogeniônico, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos da adaptação de rizóbios às condições ácidas incluem, entre outros, o aumento de potássio e glutamato no conteúdo no citoplasma das células estressadas (AARON & GRAHAM, 1991), a acumulação de poliaminas (FUJIHARA & YONEYAMA, 1993), a produção de proteínas de choque ácido (Foster, 1993), a exclusão e expulsão de prótons H^+ (EL-HILALI, 2006), a alteração da composição lipopolissacáridos (VRIEZEN *et al.*, 2007). Além disso, vários genes, como o ACTA, ACTP, Exor, lpa e ACTR, demonstraram ser essenciais para o crescimento do rizóbio a um pH baixo (ABD-ALLA *et al.*, 2014).

Freitas *et al.* (2007), isolando bactérias a partir de solo da região Semiárida mostraram que estes apresentaram maior predisposição em suportar condições extremas de pH e salinidade. Igualmente com os resultados deste estudo onde os isolados demonstraram alta tolerância a pH, salinidade e temperatura.

Os fatores abióticos influenciam e reflete diretamente na diversidade de espécies, o aumento dos níveis de estresses ambientais geralmente tem sido relacionado à diminuição nos índices de diversidade e equitabilidade e um aumento na dominância em comunidades microbianas (GOMES, 2004).

Essa afirmação pode ser observada na figura 5, onde estão dispostas as análises de diversidade nas três áreas em estudo através da aplicação do índice de Shannon. O índice de Shannon (H') representa a diversidade do ambiente e varia de 1 a 5, quanto

mais próxima a 5 maior a diversidade. Nesse estudo, a média de diversidade foi 2,55; 2,54 e 2,41 nas áreas de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una, respectivamente, conforme demonstra a figura 4. Para a equitabilidade de Pielou (J') as médias foram 2,28 para Arcoverde, 2,29 para Sertânia e 2,18 na área de São Bento do Una. Considerando-se os locais de coleta, pode-se observar que a maior diversidade e equitabilidade foram registradas na área de Sertânia e Arcoverde, são as duas áreas que apresentam uma vegetação de caatinga mais conservada, o que indica que os dois ambientes não diferem muito entre si.

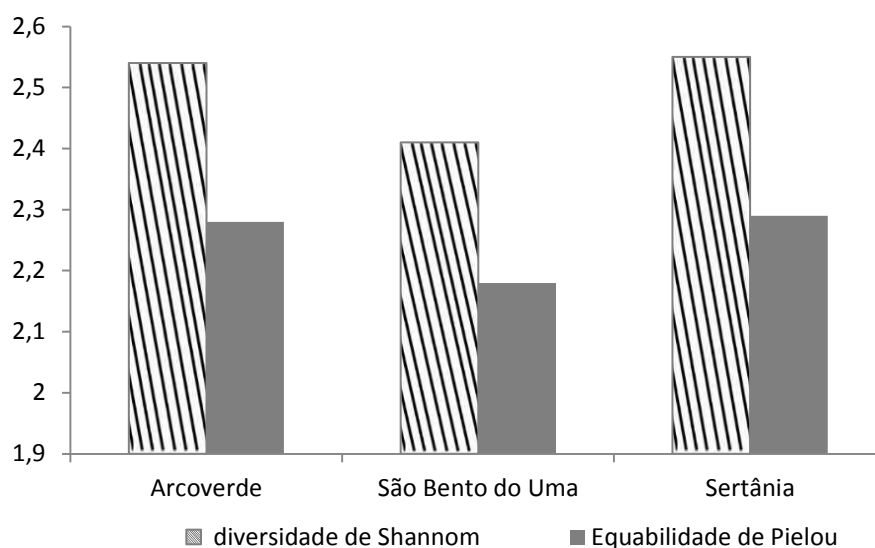


Figura 5. Diversidade dos isolados de rizóbios pelos índices de Shannon e Equitabilidade de Pielou cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Esses resultados podem indicar a capacidade do sistema em manter o funcionamento desse grupo de microorganismo, mesmo sob condição de estresse (SANTOS *et al.*, 2007). Os mesmo autores afirmam que a comunidade microbiana pode sofrer diretamente com o impacto ambiental causado pelo desmatamento e pela atividade agrícola, uma vez que sugere existir correlação muito alta entre a diversidade vegetal e a diversidade microbiana do solo; esta afirmação explicaria o fato dos isolados encontrados nas áreas de coleta em São Bento Una apresentar um decréscimo na diversidade e equitabilidade dos rizóbios; consequentemente, uma maior dominância

entre as áreas (Figura 6), já que possuem um maior grau de antropização entre as áreas estudadas, com solos levemente ácidos com menor teor de argila e matéria orgânica.

A dominância reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie, quanto mais alto for o resultado, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade (BERGER & PARKER, 1970; SIMPSON, 1949).

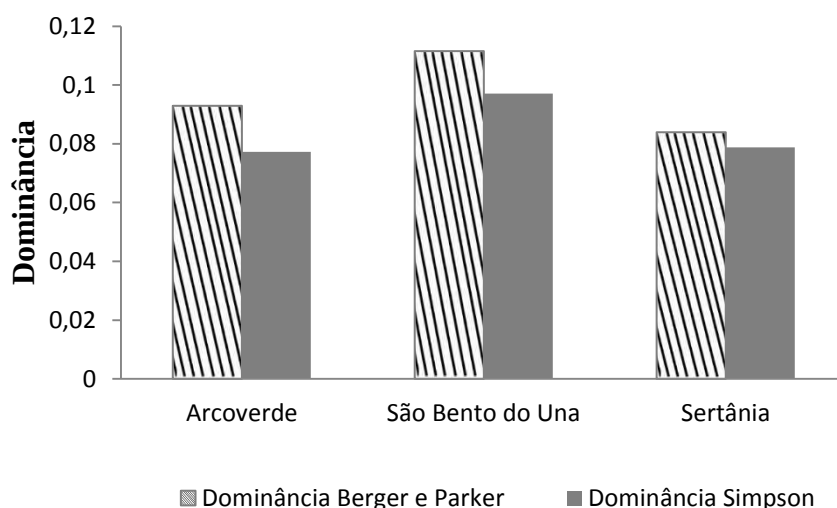


Figura 6. Dominância de Berger & Parker (1970) e Simpson (1949) relacionados a isolados nativos cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bezerra *et al.* (2005), trabalhando nos solos da Zona da Mata de Pernambuco com diferentes manejos agrícolas, onde constataram que existia maior diversidade de espécies, medida pelo índice de Shannon, em solos de área de mata nativa. Observaram ainda ser menor o índice de dominância de Simpson na mata nativa, comparadas a áreas onde era cultivada. Verificou-se que a dominância foi inversamente proporcional a equitabilidade. Santos (2001) relata que quanto menor a dominância, maior a equitabilidade de espécies de uma comunidade, mais estável será e maior resistência aos impactos ambientais que possa vir a sofrer.

De acordo com os dados, a área de São Bento do Una apresentou maior especificidade de nodulação, sendo ela considerada como espécies raras, o que elevou o índice de riqueza (Figura 7), o estimador utilizado foi o modelo não paramétrico de Jackknife 1ª ordem baseia-se na presença ou ausência de espécies únicas numa dada

comunidade, ao invés de levar em consideração a abundância das espécies (SMITH & PONTIUS, 2006).

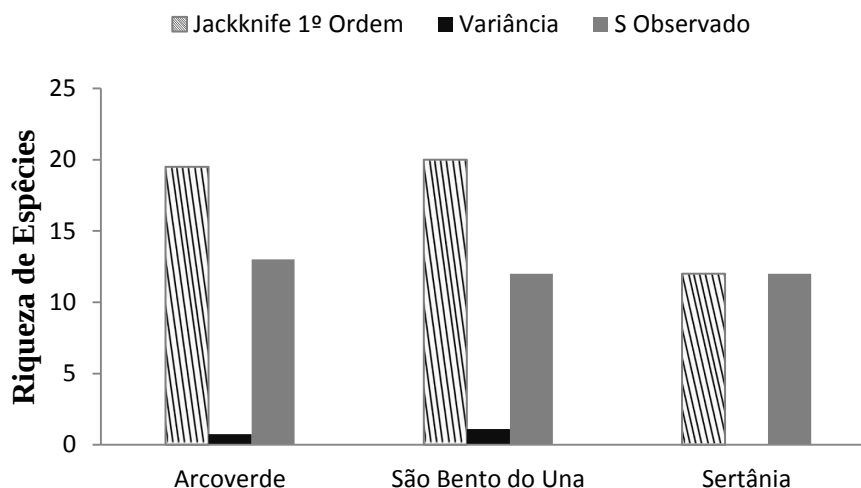


Figura 7. Riqueza de espécies de Jackknife 1º Ordem relacionados a isolados nativos cultivados em solo de diferentes regiões do Semiárido pernambucano.

4. CONCLUSÃO

Os rizóbios fixados em raízes da *Mimosa tenuiflora* de ocorrência natural nos solos das áreas localizadas em Arcoverde, Sertânia e São Bento do Una apresentam resistência a elevadas temperaturas, salinidade e pH, com maior evidência para os isolados provenientes das plantas de Sertânia.

Os rizóbios das raízes da *Mimosa tenuiflora* provenientes do solo de Sertânia apresenta maior índice de diversidade de Shannon e equitabilidade e menor grau de dominância em comparação aos solos de São Bento do Una e Arcoverde.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRONS, S. R.; GRAHAM, P. H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to acidity. **Plant and Soil**, v. 134, p.145-151, 1991.
- ABD-ALLA, M. H. et al. Alleviating the inhibitory effect of salinity stress on nod gene expression in *Rhizobium tibeticum* - fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) symbiosis by isoflavonoids treatment. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 275-284, 2014.
- ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Response to temperature stress in rhizobia. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 219–228, 2013.
- BERGER, W.H.; PARKER, F.L. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. **Science**, v.168, p. 1345-1347, 1970.
- BEZERRA, R. V. et al. Diversidade morfofisiológica de rizóbios isolados de amendoim, cultivado em solos da Zona da Mata de Pernambuco. XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo – Solos Sustentabilidade e Qualidade Ambiental. CD-ROM. Recife - PE, 2005.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 27, p.683–697, 1995.
- BROCKWELL, J. et al. Nitrogen Fixation in Acacias: an Untapped Resource for Sustainable Plantations, Farm Forestry and Land Reclamation. **Australian Centre for International Agricultural Research**. p. 132, 2005.
- CASTRO, S.V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque térmico hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.
- COUTINHO, H. L. C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p. 491-503, 1999.
- EL-HILALI I. *Rhizobium*-Lupine symbiosis: Micro-symbioses Biodiversity and highlighting of a multi nodular infection in *Lupinus luteus*. PhD Doctorate, University Mohammed V. Agdal., Rabat, 2006.
- FREIRE, A. L. O.; RODRIGUES, T. J. D. A salinidade do solo e seus reflexos no crescimento, nodulação e teores de N, K e Na em leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Vit.). **Revista de Engenharia Ambiental**, v. 6, p. 163-173, 2009.
- FREITAS A. D. S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- FUJIIHARA S.; YONEYAMA T. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean *Rhizobia fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p. 1104-1109, 1993.

GOMES A. S. *Análise de dados ecológicos*. Universidade Federal Fluminense instituto de biologia, p. 30, 2004.

GOMES, D. F. et al. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. **BMC Microbiology**, v.12, p. 84, 2012.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p. 151-164, 2000.

KULKARNI, S.; NAUTIYAL, C. S. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 Nodulating *Prosopis juliflora*. **Current Microbiology**, v. 40, p. 221-226, 2000.

LAPEZ-GO'MEZ, M.; PALMA, E.; LLUCH, C. Strategies of Salt Tolerance in the Rhizobia-Legume Symbiosis. Beneficial Plant microbial Interactions: **Ecology and Applications**. p. 99, 2013.

MARGALEF, R. Information theory in ecology. **Generation Systems**. v. 3, p. 36-71, 1958.

MEDEIROS, E. V. et al. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 9, p. 159-168, 2007.

NISTE, M. et al. Stress Factors Affecting Symbiosis Activity and Nitrogen Fixation by *Rhizobium* Cultured *in vitro*. **Pro Environment ProMediu**, v. 6, p. 42-45, 2013.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 899-905, 2004.

NUNES, G. F. O. et al. Tolerância de rizóbios isolados de duas cultivares de guandu à salinidade e a elevada temperatura *in vitro*. In: 32º CONGRESSO BRASILEIRO CIÊNCIAS SOLO, Fortaleza, 2009. Anais, 2009.

ODUM, E. P. *Populações em comunidades*. In: Odum, E.P., eds, Ecologia. São Paulo: Guanabara Koogan, p.258-272, 1988.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, v.36, p.303-315, 1998.

PEREIRA, S. I. A., LIMA, A. I. G.; FIGUEIRA, E. M. A. P. *Rhizobium leguminosarum* isolated from agricultural ecosystems subjected to different climatic influences: the relation between genetic diversity, salt tolerance and nodulation efficiency. **Soil ecology research development**, p. 247-263, 2008.

PIELOU E. C. The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal Ecology**, n.47, p. 607-613, 1959.

REBOUÇAS, M.A. et al. Crescimento e conteúdo de N, P, K e Na em três cultivares de algodão sob condições de estresse salino. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, n.1, p.79-85, 1989.

ROSADO, A. S.XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. VIII Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. VI Simpósio Brasileiro de microbiologia do solo. III Reunião Brasileira de Biologia do solo. Biodinâmica do Solo. Fertbio CD-ROM Palestra... Santa Maria, 2000.

ROTHSCHILD, D. I. Anatomia del nódulo radical de origen bacteriano en *Adesmia* DC. (*Leguminosae*) - Contribucion a La taxonomia y filogenia de la familia. **Revista del Museu Argentino de Ciencias Naturales**, v.3, n.3, p.161-191, 1967.

SADOWSKY, M. J. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation, in: Werner D and Newton WE (Eds.) Nitrogen Fixation Research in Agriculture, Forestry, Ecol. Environ. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 89-102, 2005.

SAMRUDHI, R. et al. Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 2, p. 102-108, 2013.

SANTOS, C. E. R. S. Diversidade de rizóbio nativo da região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. 2001. 178f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

Santos, C. E. R. S. et al. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SHANON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v.27, p. 379-423 e 623-656, 1948.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S; STAMFORD, N. P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 1327-1333, 2002.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, p.688, 1949.

SMITH, D. C.; PONTIUS, J. S.; Jackknife Estimator of Species Richness with S-PLUS. **Journal of Statistical Software**, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2006.

THIES, J.E.; WOOMER, P.L.; SINGLETON, P.W. Enrichment of *Bradyrhizobium* spp populations in soil due to cropping of the homologous host legume. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 633-636, 1995.

VENTORINO, V. et al. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 811-823, 2012.

VINCENT, J. M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Scientific Publications Oxford: **Blackwell Scientific**, p. 164, 1970.

VRIEZEN, J. A. C.; BRUIJN, F. J.; NUSSLEIN, K. Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3451–3459, 2007.

YURA, T.; KANEMORI, M.; MORITA, M. T. *The Heat shock response: regulation and function*, In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C., p. 3-18, 2000.

XAVIER, G. R. et al. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 01-09, 2007.

Zahran, H. H. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 63, p. 968-989, 1999.

Capítulo IV

AVALIAÇÃO GENÉTICA DE RIZÓBIOS SIMBIONTES DA JUREMA PRETA (*Mimosa tenuiflora*) NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

Avaliação genética de rizóbios simbiossantes da Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.) no semiárido pernambucano

RESUMO:

Os solos brasileiros, em geral, apresentam uma população abundante de rizóbios capazes de nodular e fixar N₂ em simbiose com a Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*); porém, a diversidade dessas bactérias ainda é pouco conhecida. Este estudo teve por objetivo avaliar a biodiversidade de rizóbios da Jurema preta no Semiárido pernambucano e, para isso, foram obtidos 84 isolados de nódulos de plantas cultivadas em casa de vegetação, proveniente de 3 áreas de Pernambuco, os isolados foram selecionados com base nos atributos morfofisiológicos. Pela análise dos perfis de DNA após a amplificação por PCR, usando o *primer* BOX-AIR, que codifica regiões conservadas e repetidas do genoma. Os perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação do gene 16S ribossômico, seguida pela digestão com duas enzimas de restrição (técnica de PCR-RFLP). As análises por REP-PCR com BOX-AIR indicaram grande diversidade entre rizóbios, com formação de 9 grupos e 50 perfis distintos, porém não há correlação dos isolados com a região de procedência. A correlação cofenética obtida entre a matriz de distância de dissimilaridade e a matriz de distância cofenética foi $r = 0,939$ considerada alta e significativa, evidenciando a consistência dos agrupamentos. Com base nos resultados por PCR-RFLP do 16S rRNA com os produtos de restrição demonstraram diversidade genética elevada entre os isolados nativos com formação de 10 grupos, esses grupos se organizaram de acordo com a região de procedência e um total de 62 perfis distintos, com coeficiente de correlação cofenético de $r = 0,86$, sendo considerado alto e significativo, apresento ainda porcentagens de distorções de 1,83% e de estresse de 13,55%, mostrando um bom ajuste entre a matriz de similaridade genética e a representação gráfica do dendrograma. Essa diversidade genética pode representar uma fonte importante de genes com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: diversidade, microrganismos, enzimas de restrição, caantiga

Genetic evaluation of rhizobia symbionts of Black Jurema (*Mimosa tenuiflora* (Willd.)
Poir.) in the semiarid region of Pernambuco

ABSTRACT:

Brazilian soils generally have an abundant population of rhizobia capable of nodular and N₂ fixation in symbiosis with the Black Jurema (*Mimosa tenuiflora*); however, the diversity of these bacteria is still unknown. This study aimed to evaluate the biodiversity of rhizobia Black Jurema in the Pernambuco Semiarid and, therefore, were obtained 84 isolates of nodules of plants grown in the greenhouse, from 3 areas of Pernambuco, the isolates were selected based on attributes morphophysiological. By analyzing the DNA profile after PCR amplification using the primer-AIR BOX, and repeated encoding conserved regions of the genome. The electrophoretic profiles obtained by amplification of 16S ribosomal RNA, followed by digestion with two restriction enzymes (PCR-RFLP). Analyses by REP-PCR with BOX-AIR showed great diversity among rhizobia, with training of 9 groups and 50 different profiles, but there is no correlation of isolates with the region of origin. The cophenetic correlation between the dissimilarity distance matrix and cophenetic distance matrix was $r = 0,939$ considered high and significant, showing the consistency of agrupamentos. Com based on the results by PCR-RFLP 16S rRNA with the restriction products showed high genetic diversity among native isolates with 10 training groups these groups were organized according to region of origin and a total of 62 different profiles with cophenetic correlation coefficient of $r = 0.86$, considered high and significant, yet present percentages of 1.83% and distortions stress of 13.55%, showing a good fit between the array of genetic similarity and the graphic representation of the dendrogram. This genetic diversity may represent an important source of genes with biotechnological potential.

Keywords: diversity, microorganisms, enzymes restrição, caantiga

1. INTRODUÇÃO

O estudo da biodiversidade de rizóbio busca entender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar genótipos tolerantes aos distintos estresses ambientais que vão limitar a simbiose (STRALIOTTO e RUMJANECK, 1999). Estes estudos podem promover não só a classificação taxonômica desses rizóbios nativos, mas os conhecimentos ecológicos e através da seleção de bactérias mais eficientes e adaptáveis a seu ambiente específico, bem como gerar informação sobre a funcionalidade dessas bactérias em ambientes semiáridos.

Uma possível domesticação dessas estirpes pode ser a “chave”, pois através da inoculação de rizóbios simbióticos em leguminosas dispensa a aplicação de adubos nitrogenados nos solos e provê um aumento na segurança ecológica observada no equilíbrio ambiental.

O advento dos métodos moleculares baseados em estudos do genoma bacteriano constituiu-se numa fonte abundante de dados para rizóbio. A taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas em diferentes ecossistemas, em geral tem sofrido uma revisão substancial, devido aos métodos moleculares de análise filogenética (CHEN et al., 2000; GRANGE; HUNGRIA, 2004; McINNIS et al., 2004). Os dados levantados nos estudos genéticos de populações dos diferentes gêneros de rizóbio indicam haver um alto grau de diversidade genética deste grupo (SIKORA; REDZEPOVIC, 2003). Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela técnica de BOX-PCR, particularmente em avaliações da diversidade genética entre rizóbios, sendo um método eficiente para diferenciar estirpes (FERNANDES et al., 2003) e pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que do gene 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo, suficientemente variável e com uma quantidade de informações capazes de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WEISBURG et al., 1991; CHUEIRE et al., 2000).

Apesar dos avanços nas metodologias para a avaliação da biodiversidade, ainda pouco se conhece sobre as bactérias simbióticas fixadoras de N₂ nos ecossistemas brasileiros; particularmente em se tratando de Semiárido, estes dados são quase inexistentes. Nesse contexto, este trabalho objetivou-se determinar a diversidade de rizóbios isolados de plantas da *Mimosa tenuiflora* coletadas em campo em três regiões

Semiáridas Pernambucanas, pela análise dos perfis de DNA amplificado (PCR) utilizando o “primer” BOX e o gene 16S ribossomal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Dos 216 isolados selecionados quanto à caracterização morfológica e fisiológica a partir das diferentes áreas em estudo, 84 foram selecionados e submetidos à reação de PCR com o *primer* BOX A1R e PCR-RFLP do gene ribossomal 16S RNAr.

As culturas puras de bactérias estavam armazenadas em meio TY com 25% de glicerol, a -4° C. Os isolados as bactérias foram descongeladas, e incubados em meio de cultura YM e o corante vermelho congo, de acordo com metodologia descrita por Vincent (1970), após a observação do crescimento, foi replicadas em 15 ml de meio YMA e incubadas a 28°C, no escuro, na BOD durante três dias.

2.1 Diversidade genética de isolados

2.1.1. Amplificação do DNA pela Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o *primer* Específico BOX A1R (REP-PCR)

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR com o “primer” BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). Para a reação de amplificação utilizou-se a própria colônia das bactérias, procedimento descrito por van der Wolf e van der Zouwen (2010), com algumas modificações. As bactérias foram tiradas com um palito estéril e suspensas na reação de amplificação com um volume final de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão PCR 10x; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de dNTPs (1,5 mM de cada base); 2,5 µL de “primer” 50 pmol µL⁻¹; 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5 U µL⁻¹ e 17,8 µL de água ultra pura. Para amplificação, utilizou-se o programa descrito por Versalovic et al. (1994) com as modificações especificadas por Hungria et al. (2008): 1 ciclo a 95°C por 7 minutos para desnaturação inicial; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturação), a 53°C por 1 minuto (anelamento) e a 65°C por 8 minutos (extensão); seguido de 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 minutos; mantendo-se a 4°C (Figura 1).



Figura 1. Termociclador modelo TC-Plus Techne Bibby Scientific Ltd (Techne TC-412).

As amostras (diluídas) foram corridas em gel de agarose a 1,5% [1,08 g de agarose em 72 mL de TBE 1X (10,8 mL de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0)], contendo como corante brometo de etídio (3 μ L de brometo de etídio /200 mL de tampão TBE) e colocado em uma cuba Horizontal R 12 x 12 cm (Figura 2A). Nas canaletas do gel foram colocados 10 μ L de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foram colocados 4 μ L, por canaleta, do padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA Ladder TM (Invitrogen TM) (Figura 2B). O DNA foi submetido à eletroforese horizontal a 100 V por 2 horas. Os géis foram visualizados em fotodocumentador modelo Geo-Logic 212 Pro-Carestream.



Figura 2. Cuba horizontal de eletroforese (A), gel de agarose com as amostras na canaleta (B).

2.1.2. Amplificação do DNA pela Reação de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S rRNA

O gene ribossomal 16S foi amplificado com o uso dos “primers” fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), descritos por Weisburg et al. (1991).

Para a reação de amplificação utilizou-se a própria colônia das bactérias, procedimento descrito por van der Wolf e van der Zouwen (2010), com algumas modificações. As bactérias foram tiradas com um palito estéril e suspensas na reação de amplificação com um volume final de 25 µL, contendo: 0,5 µL de dNTPs (1,5 mM de cada base); 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 2,5 µL de tampão PCR 10x; 2,5 µL de “primer”fD1; 2,5 µL de “primer”rD1; 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5 U µL⁻¹; colônia da bactéria; 15,3 µL de água milli Q estéril com volume final para 25 µL. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: 2 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos a 94°C por 15 segundos (desnaturação), a 55°C por 45 segundos (anelamento) e a 72°C por 2 minutos (extensão); seguido de 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos; manutenção final a 4°C (MENNA et al., 2006). Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose de 12 x 12 cm a 1,5% conforme descrito do item anterior, comparados com padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA Ladder TM (Invitrogen TM).

Para o RFLP, foi utilizada a metodologia descrita por Laguerre et al. (1994). O produto da amplificação com os “primers” fD1 e rD1 foram digerido com as seguintes enzimas de restrição: Hpa II (5' – C/CGG – 3'; 3' – GGC/C – 5') e Rsa I (5' - GT/AC – 3'; 3' - CA/TG – 5') (Invitrogen TM). Para cada reação de restrição foram utilizados 10 U de enzima, tampão específico para cada enzima (10X) conforme especificação do fabricante, 20 µL do produto de PCR e completado o volume final para 50 µL com água milli Q estéril. As reações foram incubadas a 37°C, por 15 minutos, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen TM).

Em cada canaleta do gel foi colocado 10 µL de cada amostra e 2 µL do tampão de amostra, com exceção da primeira canaleta e da última, que recebeu 4 µL, por canaleta, do padrão de peso molecular de 100 pb, (Invitrogen TM).

Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em uma cuba Horizontal R, 12 X 12 cm em gel com 3% de agarose, em TBE 0,5 X, corado com brometo de etídio, a 80 V, durante 3 horas. Após a eletroforese, os géis foram

visualizados em fotodocumentador modelo Geo-Logic 212 Pro-Carestream conforme descrito anteriormente.

2.1.3. Análise da diversidade genética

Os produtos das reações de amplificação foram classificados da seguinte forma: presença (1) e ausência (0) de bandas e convertidos em uma matriz de dados binários a partir da qual foi estimada a similaridade genética entre os acessos, por meio do coeficiente de similaridade de Jaccard (S_j) (JACCARD, 1908).

$$S_j = a/(a + b + c),$$

onde;

a presença da banda nos dois acessos i e j ;

b, presença da banda no acesso i e ausente no acesso j ; e

c, ausência no acesso i e presença no acesso j .

O ponto de corte do dendrograma e definição dos grupos foram gerados pelo método hierárquico descrito por Mojena (1977), que sugere procedimento baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões (distâncias) no dendrograma, cuja proposta é selecionar o número de grupos no passo j que, primeiramente, satisfizer a inequação:

$$a_j > q_k$$

onde:

a_j é o valor de distância do nível de fusão correspondentes aos passo j ($j=1, 2, \dots, g-1$); e

q_k é o valor referencial de corte, dado por:

$$q_k = a + k s_a$$

onde:

a , média;

S_a , desvio padrão dos valores de a ;

k , constante cujo valor a ser adotado como regra para definição dos grupos é igual a 1,25.

Assim, tem-se que:

$$\bar{a} = \frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \quad e \quad S_a = \sqrt{\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j^2 - \left(\frac{1}{g-1} \sum_{j=1}^{g-1} a_j \right)^2 / (g-2)}$$

Com base na matriz de dissimilaridade, foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento da distância média entre grupo (UPGMA). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962), usando o Software Genes (CRUZ, 2006).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Quando o DNA dos 84 isolados foi amplificado e analisado por REP-PCR com o “primer” BOX, um total de 12 isolados não foram amplificados, possivelmente por não ter sítios de anelamento no DNA, como consequência de mutação de oligonucleotídeos específicos (Judd et al., 1993) e, portanto, não foi utilizada na análise conjunta. Para os demais, constatou-se um total de 22 bandas amplificadas, onde todos os fragmentos foram polimórficos (Figura 3).

Este dados discordam dos resultados encontrados por Mena et al (2009) e Hungria et al. (2008) que indicaram na análise REP-PCR com o “primer” BOX perfis com maior número de bandas. Porém, trabalho realizados recentemente por Martins et al. (2015) que indicaram que análise com o “primer” BOX em *Mimosa caesalpinifolia*, resultou em perfis com até 25 bandas.

Na análise dos perfis de REP-PCR, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard e considerando o nível de dissimilaridade genética de 78% na análise de agrupamento (Figura 4). Os 73 isolados bacterianos avaliados formaram 50 perfis distintos e foram agrupados em nove grupos principais, sendo o grupo VIII e IX, os que apresentaram maior número de isolados 25 e 30, respectivamente, ambos subdivididos em dois subgrupos. É possível observar a existência de variabilidade entre

e dentro dos subgrupos, a qual pode ser atribuída ao fato dos isolados pertencerem a espécies selvagens ou pouco domesticadas.

Apenas dois grupos, VIII e IX, uniram bactérias com perfis idênticos e, no grupo VIII, houve casos de isolados semelhantes provenientes da mesma área, os isolados 2 e 4. Contudo, perfis idênticos também foram constatados em áreas distintas no grupo IX, por exemplo, os isolados 41, 48, 51 (Arcoverde), os isolados 1, 8 e 18 (Sertânia) e 63, 65 e 69 (SBU) (Figura 4).

No agrupamento VIII ocorreu o predomínio de amostras da região Sertânia com 17 Isolados e o grupo IX com 15 dos 30 isolados provenientes da região Arcoverde (Figura 4). Os isolados 56 (Arcoverde), 71 (São Bento do Una), 37 (Sertânia), 68 (Arcoverde), 29 (Sertânia) pertencentes aos grupos I, II, III, IV e V, respectivamente, foram distintos em relação ao restante, os demais isolados foram distribuídos em quatro grupos: VI VII, VIII e IX, com isolados provenientes das diferentes regiões. Desse modo, não houve agrupamento claro dos isolados de acordo com a região de procedência.

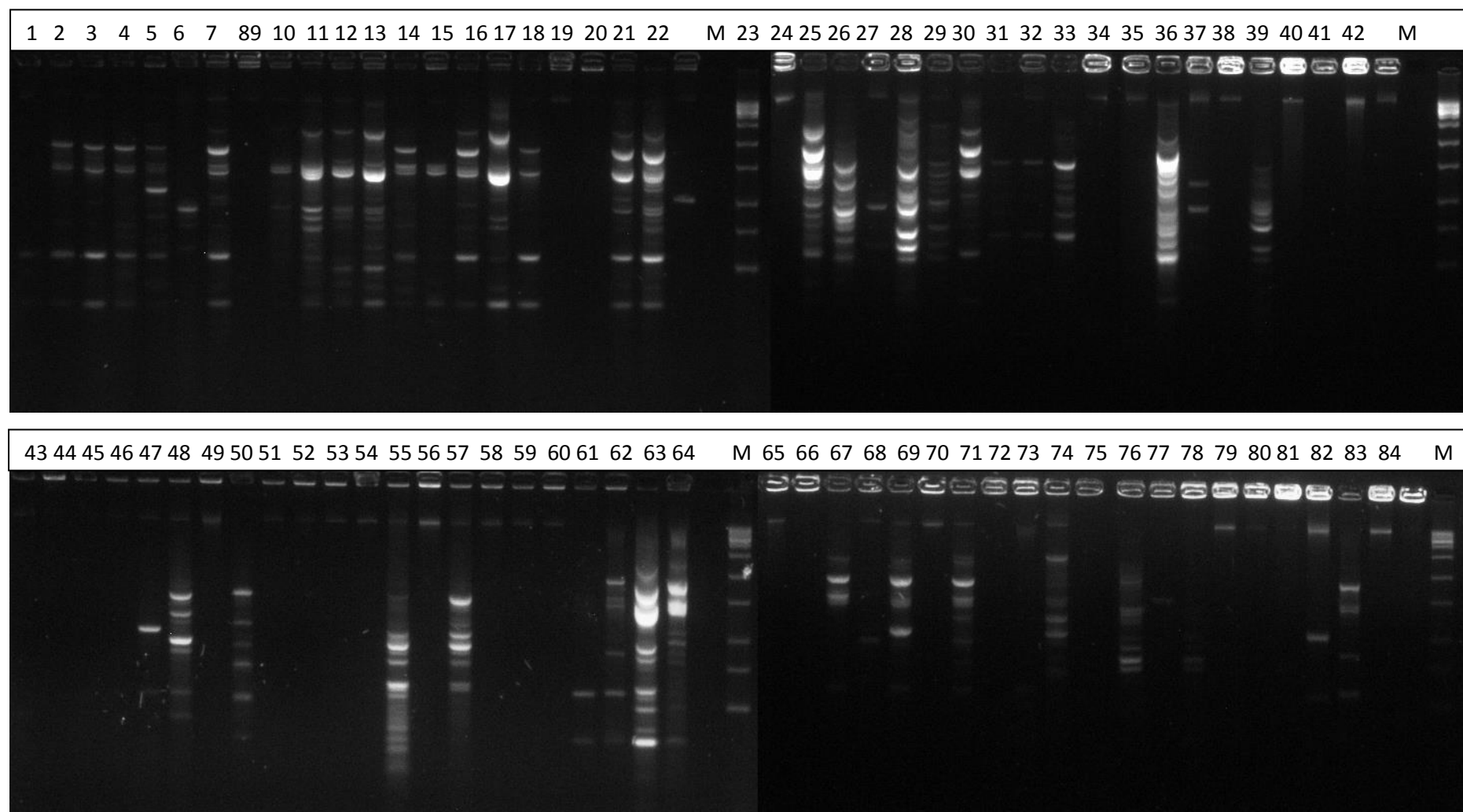


Figura 3. Perfis do DNA Amplificado dos 84 isolados por REP-PCR com o “primer” específico BOX-AIR.

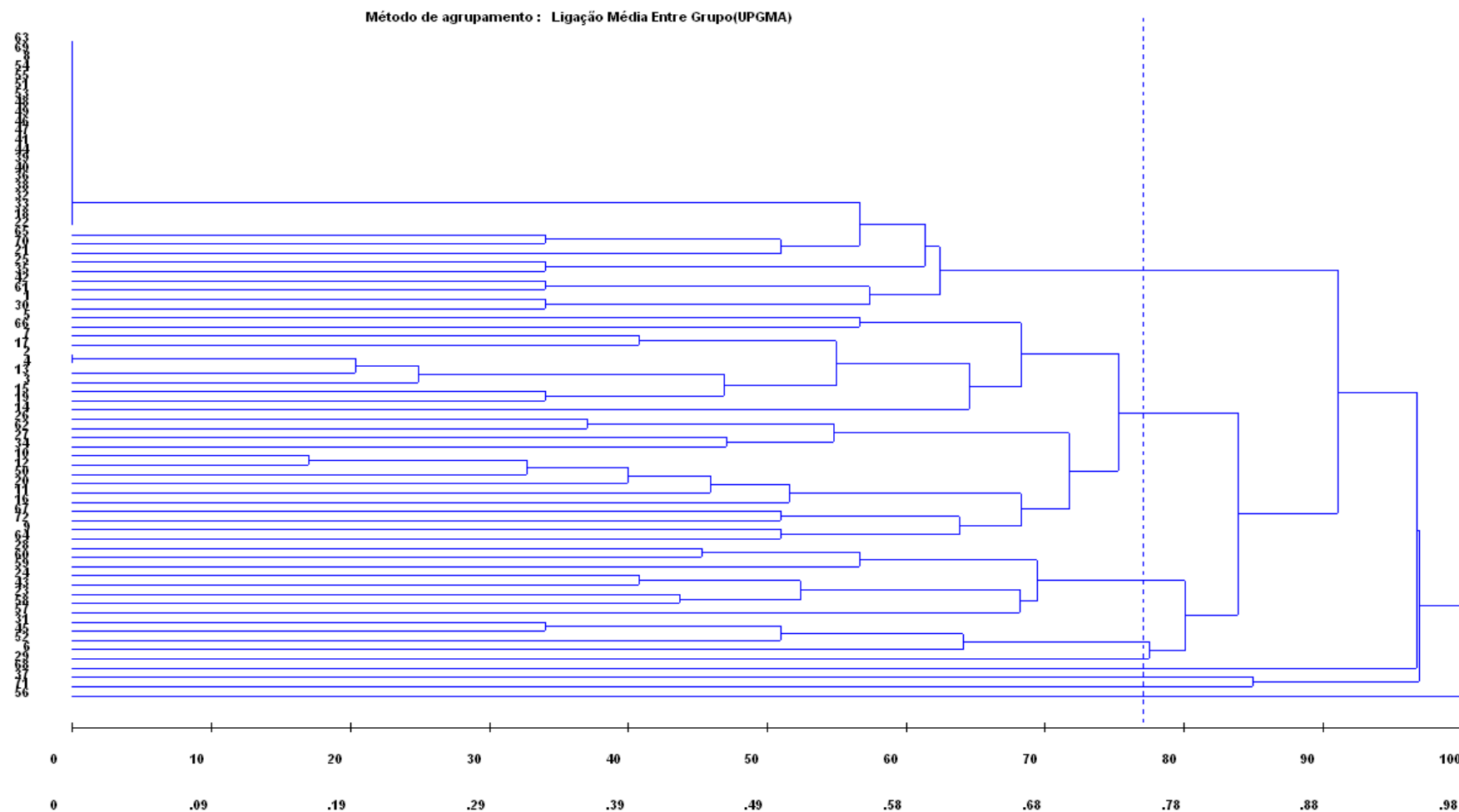


Figura 4. Dendrograma resultante da análise de agrupamento obtido pelo método UPGMA a partir de 73 isolados bacterianos provenientes da *Mimosa tenuiflora*, baseado nos dados da matriz de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard.

A maior distância foi obtida entre isolados 63 e 56 provenientes dos municípios de Arcoverde e de São Bento do Una, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que há grande diversidade genética entre as estirpes nativas de *Mimosa tenuiflora* dos isolados de Pernambuco, detectada por REP-PCR, não havendo agrupamento claro dos isolados de acordo com a região de procedência, demonstrando que existe uma grande possibilidade de especificidade de rizóbios com relação à leguminosa estudada e seus microrganismos. Os dados obtidos corroboram com estudos conduzidos por Mostasso et al. (2002) e Stocco et al. (2008), onde não houve relação entre os agrupamentos e a origem das estirpes.

O polimorfismo de perfis de DNA obtidos por REP-PCR com oligonucleotídeos específicos tem mostrado grande aplicabilidade para a identificação de estirpes em várias espécies de bactérias, inclusive nos rizóbios (BRUIJN, 1992; GRANGE & HUNGRIA, 2004; GRANGE et al., 2007; KASCHUK et al., 2006), porque em uma reação única, é possível a obtenção de um número elevado de bandas, permitindo assim a detecção de polimorfismo elevado para a análise genética das bactérias (CHUEIRE et al., 2000b).

Hungria et al (2008), estudando a análise REP-PCR com diversidade genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas por BOX-PCR observaram que este marcador é capaz de identificar uma alta diversidade genética entre microrganismos além de mostrar uma excelente distribuição de estirpes através de diferentes ecossistemas.

A correlação cofenética obtida entre a matriz de distância de dissimilaridade e a matriz de distância cofenética, obtido a partir do dendrograma, foi de elevada magnitude ($r=0,939^{**}$) considerada alta e significativa, evidenciando a consistência dos agrupamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares BOX- AIR (PCR) avaliados nos 73 isolados de *Mimosa tenuiflora*.

Correlação cofenética (CCC):	0.939
Graus de liberdade:	2554
Valor de t:	127.92
Probabilidade:	.0**
Distorção (%):	1.3631
Estresse (%):	11.6759

Segundo Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$ é considerada ideal, pois indica haver boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

Além disso, também foram observadas porcentagens de distorções (1,36%) e de estresse (11,67%) muito boas, segundo a escala de Kruskal (1964), mostrando um bom ajuste entre a matriz de similaridade genética e a representação gráfica do dendrograma.

3.2 Análises de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S r RNA

Os 84 isolados também foram avaliados pela técnica de PCR-RFLP da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, a amplificação feita com os oligonucleotídeos fd1 e rD1 produziu, nos isolados, um único fragmento, para 69 isolados, exceto com a 15 Isolados (17,26, 38, 40, 73-77 e 79a 84) que, repetidamente, apresentaram problemas na amplificação (Figura 5). Laguerre et al. (1996) e Fernandes et al. (2003), também observaram problemas na amplificação dessa região em algumas estirpes nativas, o que pode ocorrer por mutações no sitio de anelamento dos primers.

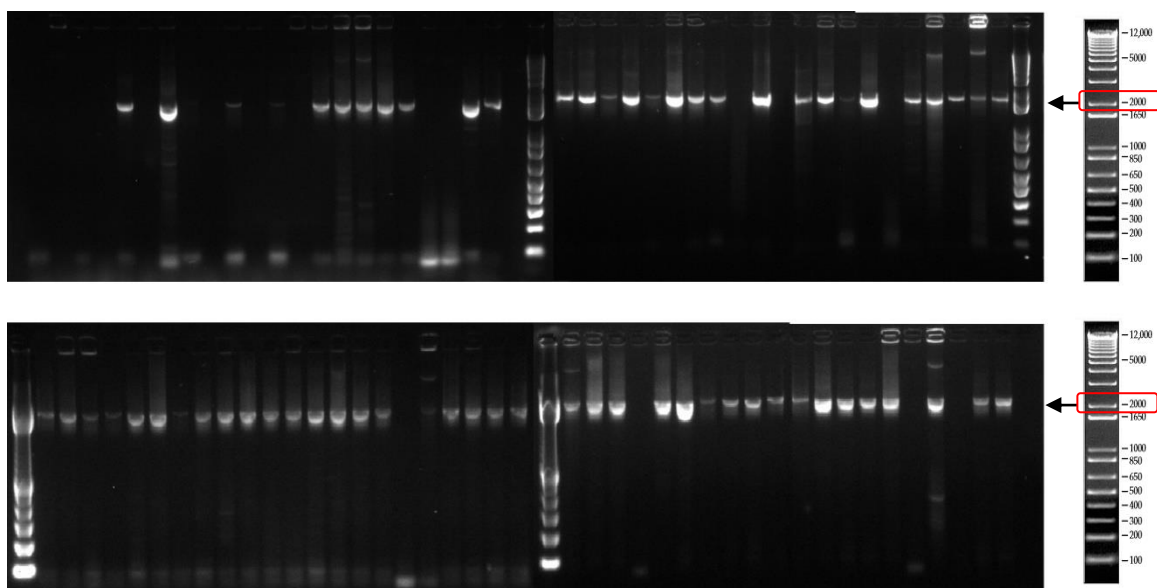


Figura 5. Perfil da amplificação do fragmento rDNA 16S de bactérias, em gel de agarose 1,5%, usando os *primers* fd1 e rD1. Marcador de 1kb plus DNA Ladder Invitrogen®.

Quando esse fragmento foi digerido com duas enzimas de restrição *HpaII* e *RsaI*, respectivamente, foi visualizados em géis de agarose 1,5%, as bandas geradas foram analisadas usando o coeficiente de Jaccard e depois gerados o dendrograma com

o algoritmo de UPGMA, constatou-se grande variabilidade genética (Figura 6) e a formação de 10 grupos com um nível de similaridade superior a 64%.

O isolado 17, de Sertânia, ocupou posição isolada formando o grupo I. Os grupos II e III foram formados por dois isolados cada, no grupo II isolados de regiões diferentes. Seguidos dos Grupos VI e VIII com 3 isolados, nestes grupos isolados das regiões de Sertânia e Arcoverde, respectivamente

O grupo IV, VI e X possuem isolados com perfis idênticos 100% de similaridade, todos isolados provenientes da mesma área. Os grupos V, VI e X, agruparam os isolados provenientes de Sertânia, Arcoverde e São Bento do Una, respectivamente.

Os grupos IX e VII foram os que reuniram maior número de isolados (Figura6). O grupo IX reuniu 24 isolados, 20 de Arcoverde e quatro da região de São Bento do Una, mas nenhum dos extremos da região de Sertânia. Ainda neste grupo pode-se verificar que os isolados 41 e 42; 59 e 60; 53,58 e 54 possuem perfis idênticos, são isolados com mesmo local de origem. No grupo VII, 13 isolados todos provenientes da região de Sertânia.

Resultados das análises detectado pela técnica PCR-RFLP da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, indicaram a partir do dendograma obtido com os produtos de restrição diversidade genética elevada entre os isolados nativos. Resultados semelhantes foram encontrados por Fernandes et al. (2003) e Stocco et al. (2008).

Diferentemente dos resultados obtidos por REP-PCR, em que não houve agrupamento claro dos isolados de acordo com a região de procedência, nas análises realizados PCR-RFLP da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16, pode-se observar uma maior formação de grupos de acordo com a região de procedência dos isolados.

Freitas et al. (2014), estudando leguminosas arbóreas da Caatinga pela PCR-RFLP da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, observam que tem uma grande diversidade entre rizóbios de leguminosas arbóreas da Caatinga, podendo existir uma especificidade destas bactérias tanto com relação à planta, como em relação à origem geográfica dos isolados

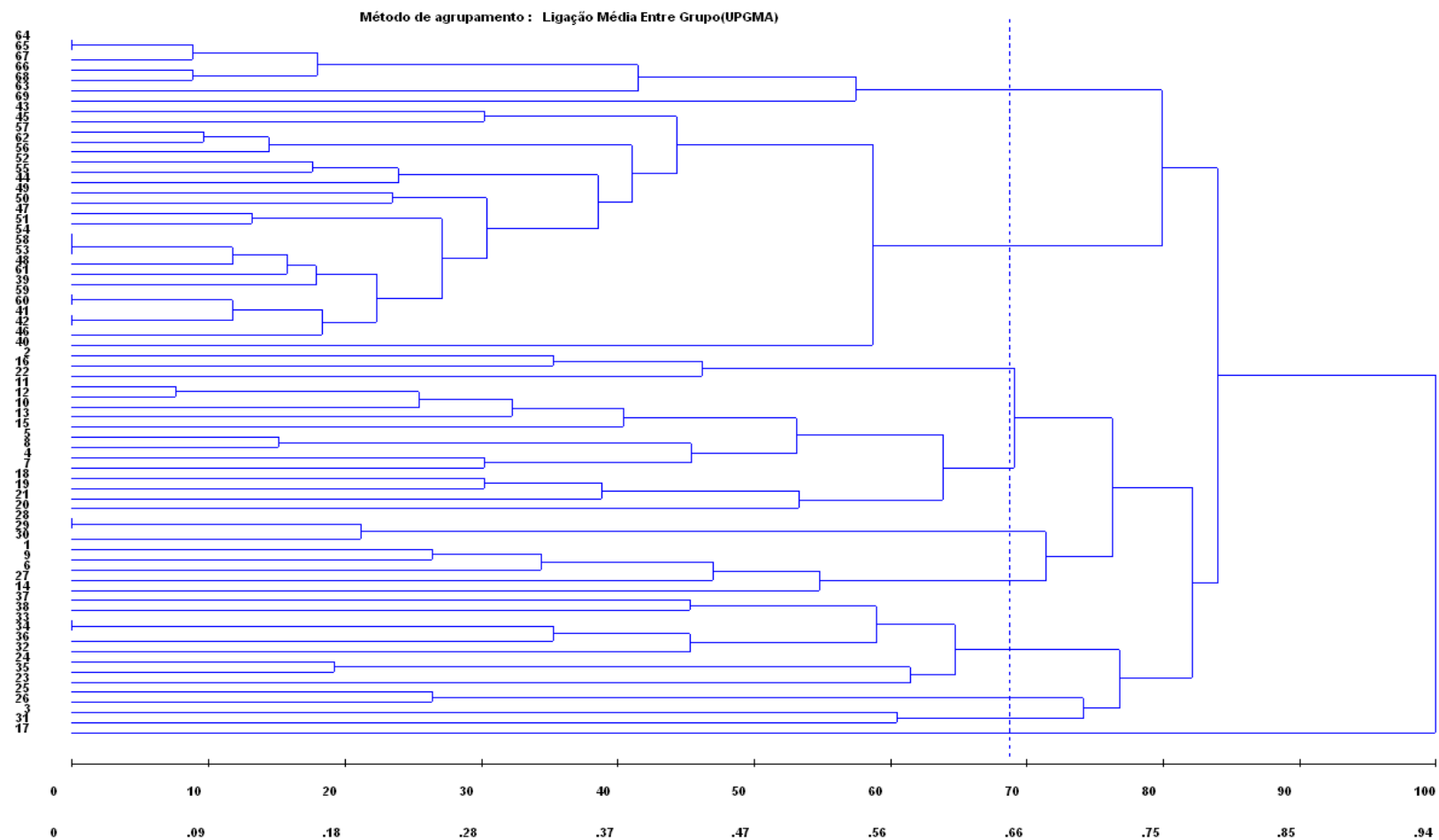


Figura 6. Dendrograma resultante da análise de agrupamento obtido pelo método UPGMA a partir de 73 isolados bacterianos provenientes da *Mimosa tenuiflora* baseado nos dados da matriz de dissimilaridade genética obtidos pelo complemento aritmético dos coeficientes de similaridade de Jaccard, utilizando-se PCR-RFLP do gene ribossomal 16S, com a amplificação com os oligonucleotídios fD1 e rD1 digerido com duas enzimas de restrição *Hpa*II e *Rsa*I.

O coeficiente de correlação cofenético (CCC) obtido entre a matriz de distância de dissimilaridade e a matriz de distância cofenética ($r= 0,86^*$) com uma baixa distorção e baixo estresse (Tabela 2), considerado alto e significativo, indicando uma boa correlação entre as matrizes de distância e de agrupamento. Cruz e Carneiro (2006) afirmaram que quanto maior o CCC, menor será a distorção do agrupamento, havendo a concordância entre os valores originais de dissimilaridade e os representados pelo dendrograma, possibilitando a confiabilidade nos dados gerados.

Tabela 2. Correlação cofenética baseado nos dados moleculares (PCR-RFLP) avaliados nos 69 isolados de *Mimosa tenuiflora*.

Correlação cofenética (CCC):	0.8651
Graus de liberdade:	2344
Valor de t:	83.505
Probabilidade:	.0**
Distorção (%):	1.838
Estresse (%):	13.5572

Apresento-se ainda porcentagens de distorções (1,83%) e de estresse (13,55%) que, segundo a escala de Kruskal (1964) são classificados como bons, mostrando um bom ajuste entre a matriz de similaridade genética e a representação gráfica do dendrograma (Tabela 3).

Até o presente momento, foram feitos poucos levantamentos sobre as espécies de rizóbios microssimbiontes em solos do Semiárido brasileiro. Este estudo é pioneiro na caracterização da diversidade genética de comunidades de rizóbios de *Mimosa tenuiflora* em solos pernambucanos.

Além disso, os resultados também variam com a planta utilizada como isca para os rizóbios (MERCANTE et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999), método de amostragem, (ALBERTON et al., 2006), metodologia de avaliação (KASCHUK et al., 2006) e condições ambientais (STRALIOTTO et al., 1999), dentre outros.

4. CONCLUSÃO

Os perfis resultantes dos marcadores moleculares (REP-PCR) indicam que há alta diversidade genética nos rizóbios fixados nas raízes de *Mimosa tenuiflora*, independente do solo proveniente das áreas de ocorrência natural da espécie.

Os perfis resultantes da técnica de PCR-RFLP do gene 16S rRNA, possibilita associar e organizar os rizóbios fixados nas raízes de *Mimosa tenuiflora* em relação ao solo das áreas de ocorrência da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberton, O.; Kaschuk, G.; Hungria, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology Biochemistry**, v.38, p.1298–1307, 2006.

BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, n.58, p.2180-2187, 1992.

CHEN, L.S. et al. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5099-5103, 2000.

CHUEIRE, L. M. O. et al. *Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro*. Londrina: Embrapa-CNPSo, p. 32, 2000a. (Boletim de Pesquisa, 3).

CHUEIRE, L. M. O. et al. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, p. 80-95, 2000b.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. UFV, Viçosa, p. 648, 2006.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, v2, p. 585, 2006.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 38, n. 8, p. 911-920, 2003.

FREITAS, A.D.S. et al. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, n.8, p. 788-796, 2014.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia in two Brazilian ecosystem. **Soil Biology Biochemistry**, n.36, p.1389-1398, 2004.

GRANGE, L. et al. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, n.39, p.867-876, 2007.

HUNGRIA, M. et al. *Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas por BOX-PCR*. Comunicado Técnico-EMBRAPA n.79, p. 12, 2008.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Societé Vaudoise des Sciences Naturelles**, v.44, p.223-270, 1908.

LAGUERRE, G. et. al. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

KASCHUK, G. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, n.32, p.210-220, 2006.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrik**, v.29, p. 1-27, 1964.

MARTINS, P. G. S. et al. Mimosa caesalpiniiifolia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 1-10, 2015.

MCINNES A. et al. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities – a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p.1295-1308, 2004.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MERCANTE, F.M. et al. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian “cerrado” region. **Review of Microbiology**, v.29, p.49-58, 1998.

MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v.20, p.359-363, 1977.

MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

SIKORA, S.; REDZEPOVIC, S. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, REP-PCR and RAPD analysis. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 61-67, 2003.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *The comparison of dendrograms by objective methods*. Taxon, v. 11 p. 33-40. 1962.

STOCCO, P. et al. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p.1107-1120, 2008.

STRALIOTTO, R. et al. Diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.71, p.531- 543, 1999.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. *Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 58, 1999. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 93).

VAZ PATTO, M.C. et al. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, p.63-67, 2004.

VERSALOVIC, J. et al. *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*. Methods in Molecular and Cell Biology, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of rootnodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific (International Biological Programme Handbook, 15), p. 164, 1970.

WEISBURG, W.G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados revelados pelas análises morfofisiológicas e moleculares por REP-PCR e por RFLP-PCR do 16S rRNA dos isolados nativos de diferentes regiões pernambucanas indicaram diversidade intra-específica e interespecífica elevada. Essa diversidade morfofisiológica e genética pode representar uma fonte importante de genes com potencial biotecnológico para a agropecuária e para o meio ambiente, bem como, de estirpes com maior capacidade de fixação biológica do N₂. Porém, para confirmar essa inferência e esclarecer a posição taxonômica desses isolados, tornam-se necessários estudos genéticos mais aprofundados, como o seqüenciamento da região 16S rRNA.

ANEXOS

ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizadas para estudo da população bacteriana.

Meio de cultura LMA (Vincent, 1970)

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Agar	15,00g
Água destilada	1000 mL
Ajuste de ph para 6,8	

Meio de cultura LM (Vincent, 1970)

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Água destilada	1000 mL
Ajuste de ph para 6,8	

Azul de Bromotimol (Hungria, 1994)

Solução estoque	0,5g L ⁻¹
Água destilada	1000 mL

Vermelho Congo (Hungria, 1994)

Solução estoque	2,5g L ⁻¹
Água destilada	1000 mL

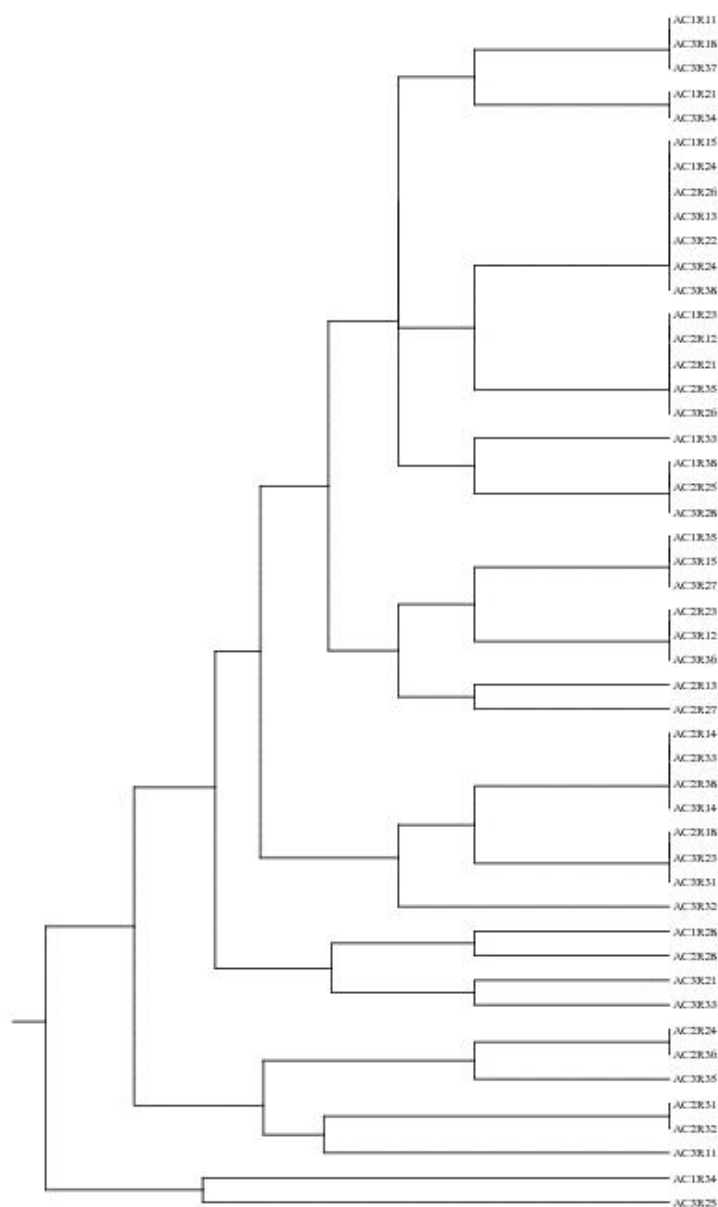
Meio TY

Tryptona	5 g
Extrato de levedura	0,75 g
KH ₂ PO ₄	0,454 g

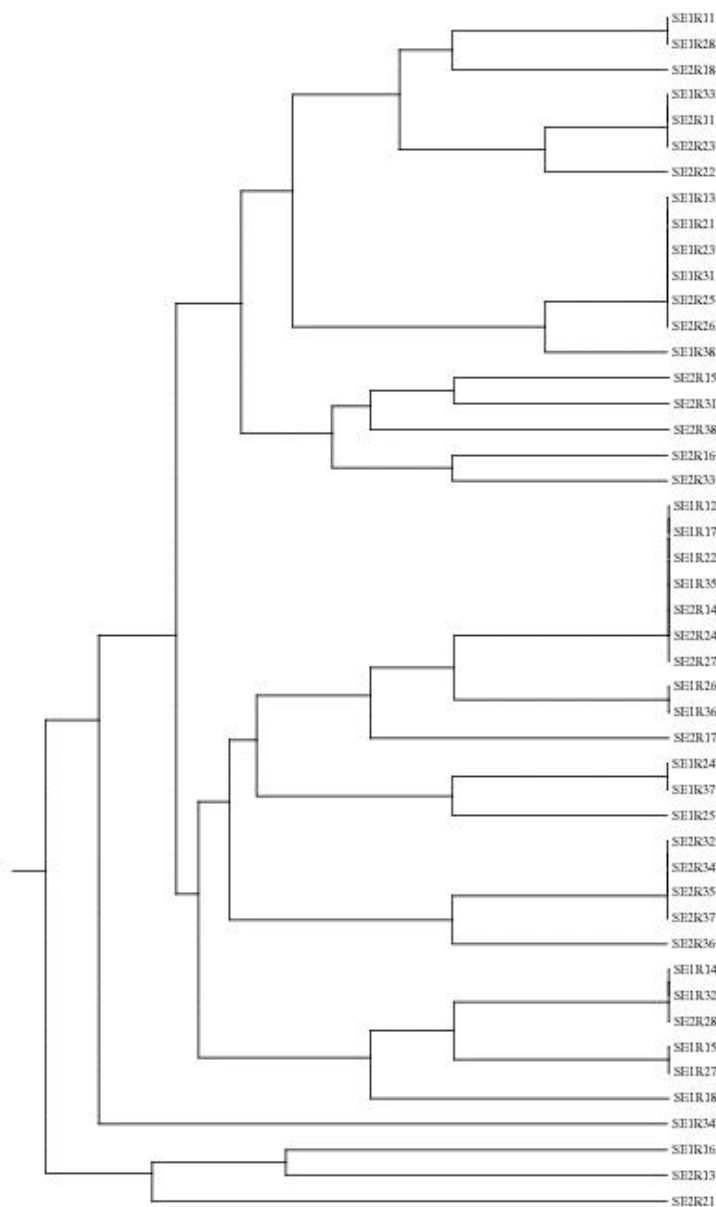
Na₂HPO₄. 7 H₂O
Água destilada
pH = 6,8

1,79 g
1000 mL

ANEXO B – Dendrograma de similaridade em função das características cultural dos isolados obtidos da jurema preta na região de Arcoverde, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



ANEXO C – Dendrograma de similaridade em função das características cultural dos isolados obtidos da jurema preta na região de Sertânia, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



ANEXO D – Dendrograma de similaridade em função das características cultural dos isolados obtidos da jurema preta na região de São Bento do Una, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

