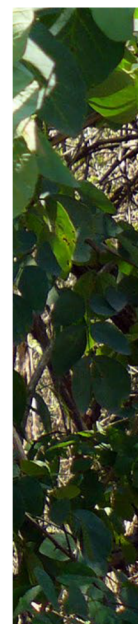
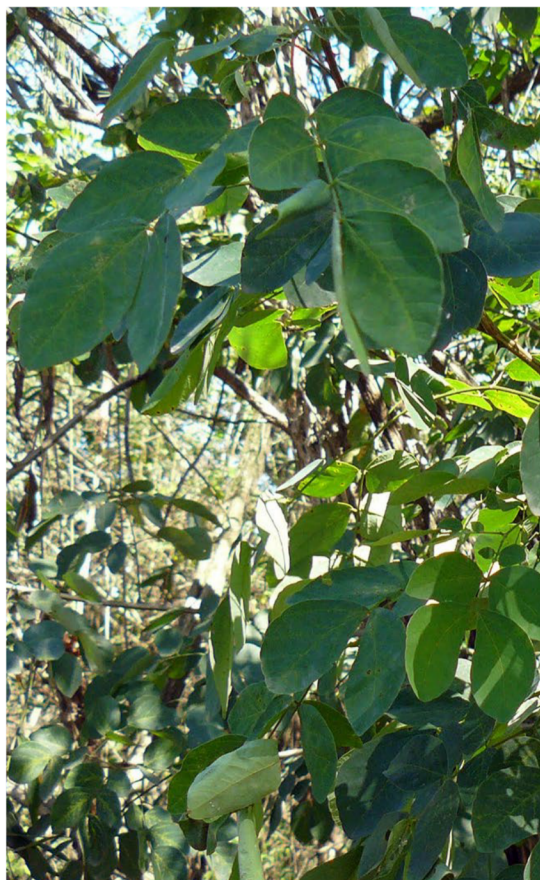
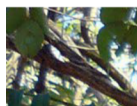


Estirpes de Rizóbio Indicadas para a
Inoculação de *Mimosa caesalpinifolia*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
106**

Estirpes de Rizóbio Indicadas para a
Inoculação de *Mimosa caesalpinifolia*

*Isabelly Santos Rosado de Oliveira
Ederson da Conceição Jesus
Thiago Gonçalves Ribeiro
Maura Santos Reis de Andrade da Silva
Jairo de Oliveira Tenório
Lindete Míria Vieira Martins
Guilherme Montandon Chaer
Sérgio Miana de Faria*

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2021

Unidade Responsável pelo conteúdo:
Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia**

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Claudia Pozzi Jantalia, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Marta dos Santos Freire Ricci de
Azevedo, Nátia Élen Auras*

Unidade Responsável pela edição:
Embrapa Agrobiologia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo CRB 7/5043

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Sérgio Miana de Faria

1ª edição
Publicação digital – PDF (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

ESTIRPES de Rizóbio Indicadas para a Inoculação de *Mimosa caesalpiniiifolia*. /
Isabelly Santos Rosado de Oliveira *et. al.* — Seropédica: Embrapa Agrobiologia,
2021.

Livro Digital. (PDF): (Embrapa Agrobiologia Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento, 106).

ISSN: 1676-6709.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Nodulação. 3. Leguminosa. 4.
Paraburkholderia. I. Jesus, Ederson da Conceição. II. Ribeiro, Thiago Gonçalves.
III. Silva, Maura Santos Reis de Andrade da. IV. Tenório, J. de O. V. Martins, Lindete
Míria Vieira. VI. Chaer, Guilherme Montandon. VII. Faria, Sérgio Miana de. VIII.
Embrapa Agrobiologia. IX. Série.

CDD (23. ed.). 631.847

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Conclusões	19
Agradecimentos	19
Referências Bibliográficas	20

Estirpes de Rizóbio Indicadas para a Inoculação de *Mimosa caesalpinifolia*

Isabelly Santos Rosado de Oliveira¹

Ederson da Conceição Jesus²

Thiago Gonçalves Ribeiro³

Maura Santos Reis de Andrade da Silva³

Jairo de Oliveira Tenório⁴

Lindete Míria Vieira Martins⁵

Guilherme Montandon Chaer²

Sérgio Miana de Faria²

Resumo – O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) é uma espécie pioneira de ampla adaptabilidade, com alta capacidade de regeneração e resistência à seca, características que a tornam uma excelente opção para a revegetação e recuperação de áreas degradadas. Ela se associa simbioticamente a rizóbios, porém não há ainda estirpes recomendadas para incrementar a fixação biológica de N₂. Dentro desse contexto, avaliou-se o potencial de estirpes de rizóbio para fixarem N em simbiose com sabiá. Rizóbios foram isolados de nódulos de sabiá inoculados com amostras de solos provenientes das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Os isolados foram autenticados e vinte e um deles foram positivos para nodulação. Estes foram caracterizadas pelo sequenciamento do gene RNAr 16S e inoculados em sementes de sabiá plantadas em vasos de Leonard visando avaliar sua eficiência e eficácia simbióticas. As plantas foram coletadas após 90 dias para determinação do acúmulo de biomassa vegetal e do cálculo de eficiência e eficácia das estirpes. As estirpes foram classificadas em sua maioria nas espécies *Paraburkholderia sabiae* e *P. diazotrophica*. Também foram isoladas estirpes de *Rhizobium* sp.

¹ Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 7, s/n, Zona Rural, Seropédica, RJ, CEP 23890-000. E-mail: isabelly_bio@yahoo.com.br.

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ. E-mails: ederson.jesus@embrapa.br, guilherme.chaer@embrapa.br, sergio.defaria@embrapa.br.

³ Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 7, s/n, Zona Rural, Seropédica, RJ, CEP 23890-000. E-mails: tfarllon@gmail.com, maura.sras@gmail.com.

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 7, s/n, Zona Rural, Seropédica, RJ, CEP 23890-000. E-mail: jairotenorio@hotmail.com.

⁵ Professora Titular da Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Avenida Edgard Chastinet, s/n, São Geraldo, Juazeiro, BA, CEP 48900-000. E-mail: lindete.martins1@gmail.com.

e *Trinickia symbiotica*. *P. diazotrophica* foi isolada majoritariamente de plantas inoculadas com solo do Nordeste, enquanto *P. sabiae* foi mais frequente em solos do Sudeste. As estirpes apresentaram uma ampla variação em efetividade, com destaque para as estirpes BR 13975, BR 13954, BR 13950 e BR 13966, as quais apresentaram eficácia entre 97% e 74% e eficiência de 2890% a 2207%. Todas pertencem à espécie *Paraburkholderia diazotrophica* e são de diferentes procedências geográficas. Conclui-se que a espécie *P. diazotrophica* é uma espécie potencial para prospecção de estirpes de alta eficiência para a inoculação do sabiá. As estirpes selecionadas deverão passar pela etapa III de seleção antes de serem definitivamente recomendadas.

Termos para indexação: Fixação biológica do nitrogênio; nodulação; leguminosa; *Paraburkholderia*.

Rhizobial Strains Indicated for the Inoculation of *Mimosa caesalpinifolia*

Abstract – “Sabiá” (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) is a species of broad adaptability, high regeneration ability, and drought resistant, which are desirable characteristics for its use in land revegetation. It can associate with rhizobia, but efficient selected strains are still needed. This work evaluated the biological nitrogen fixation ability of rhizobia strains in symbiosis with “sabiá”. Rhizobia were isolated from nodules of “sabiá” inoculated with soils from the Northeast and Southeast of Brazil. Twenty-one isolates were positive for nodulation. Sequencing of the 16S rRNA gene was used for their taxonomic characterization, and their efficiency and efficacy were assessed through inoculation on “sabiá” in Leonard jars. The plants were sampled after 90 days and used for the determination of biomass accumulation and strain efficiency and efficacy. Most of the strains belong to the species *P. sabiae* and *P. diazotrophica*. *Rhizobium* sp. and *Trinickia symbiotica* were also isolated. *P. diazotrophica* was mostly isolated from plants inoculated with soils from the Northeast region; *P. sabiae*, on its turn, was mostly isolated from soils from the Southeast. Strain effectiveness varied broadly. Strains BR 13975, BR 13954, BR 13950, and BR 13966 were the most efficient, with efficacy between 97% and 74% and efficiency between 2890 and 2207%. All of them belong to *Paraburkholderia diazotrophica* and were isolated from different locations. It can be concluded that *P. diazotrophica* is a potential species for prospecting highly efficient strains for the inoculation of “sabiá”.

Index terms: biological nitrogen fixation; nodulation; legume; *Paraburkholderia*.

Introdução

A espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth., conhecida popularmente como sabiá ou sansão do campo, ocorre naturalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Piauí e Ceará (Ribaski *et al.*, 2003), podendo também ser encontrada em povoamentos artificiais do Maranhão à Bahia (Rizzini, 1995) bem como em regiões úmidas dos Estados da Paraíba, Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses) e São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) (Gomes, 1977; Mendes, 1989; 2001). Trata-se de uma espécie pioneira de ampla adaptabilidade e com alta capacidade de regeneração e resistência à seca (Balbino *et al.*, 2010), características que a tornam uma excelente opção para a revegetação e recuperação de áreas degradadas (Chaer *et al.*, 2011).

O sabiá é capaz de se associar a rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), dois dos principais microssimbiontes de importância agrícola e ambiental e que contribuem com sua capacidade de se estabelecer em áreas degradadas. Os rizóbios fixam nitrogênio atmosférico e o fornecem à planta, enquanto os FMAs lhe auxiliam na absorção de água e nutrientes minerais, em especial o fósforo (Franco; Faria, 1997). No caso da simbiose com rizóbios, esta pode ocorrer com membros da família *Rhizobiaceae*, pertencente à classe α -*Proteobacteria* e, também, com membros da classe β -*Proteobacteria*, como a *Paraburkholderia sabiae*, que foi isolada de nódulos dessa planta, indicando que o sabiá se associa preferencialmente a espécies deste gênero (Elliott, 2007; Chen *et al.*, 2008).

Apesar de sua utilidade prática, atualmente não existem inoculantes à base de rizóbios recomendados e disponíveis para o sabiá. Este trabalho visou cobrir essa lacuna e, portanto, teve por objetivo selecionar estirpes eficientes de rizóbios para a inoculação dessa espécie. A avaliação foi realizada na etapa II de seleção, a qual corresponde ao teste das estirpes em substrato estéril, comumente em vasos de Leonard, tendo sido testadas estirpes de diferentes procedências.

Material e Métodos

Origem e autenticação das estirpes

As estirpes utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de nódulos de sabiá coletados diretamente no campo ou de plantas-isca inoculadas com solo de diferentes municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (Tabela 1). Estas foram isoladas em meio de cultura 79 (Fred; Waksman, 1928) e autenticadas na planta hospedeira de modo a confirmar sua capacidade de nodulação. No total foram avaliados 53 isolados, dos quais 21 foram selecionados para identificação taxonômica e para o teste de eficiência com base no resultado do ensaio de autenticação.

A autenticação foi conduzida na casa-de-vegetação da Embrapa Agrobiologia, utilizando delineamento de blocos casualizados e 3 repetições por tratamento, sendo que cada estirpe correspondeu a um tratamento. Um tratamento correspondente a plantas não inoculadas também foi empregado como controle de contaminação. Sementes de sabiá escarificadas (ácido sulfúrico 98%), desinfestadas superficialmente (etanol 70% por 30 s, H₂O₂ por 2 minutos e lavagem abundante com água estéril) e pré-germinadas foram crescidas e inoculadas em garrafas de vidro de 350 mL, contendo papel de germinação e solução nutritiva de Norris (Guzman; Döbereiner, 1968) esterilizados em autoclave.

Para o preparo do inóculo as bactérias foram cultivadas em meio 79 líquido (Fred; Waksman, 1928) sob agitação horizontal orbital (150 rpm) até apresentarem crescimento. Posteriormente, 1 mL de cada inóculo foi inoculado nas sementes pré-germinadas. As plantas foram avaliadas para a presença de nódulos após 30 dias. Os isolados positivos para a nodulação foram utilizados para as etapas posteriores de experimentação.

Caracterização Molecular

O DNA genômico dos isolados positivos para nodulação foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) conforme as instruções do fabricante. A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em Meio 79 líquido em agitação constante de 150 rpm. O DNA foi quantificado por espectrometria em um equipamento QUBIT (Invitrogen) e a concentração foi ajustada para 10 ng.µL⁻¹.

Os isolados selecionados foram submetidos à PCR para amplificação de fragmentos dos genes: 16S rRNA (Wang *et al.* 1996). A sequência dos *primers* utilizados, a concentração dos reagentes e as condições de amplificação foram descritos por Wang *et al.* (1996). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e sequenciados em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems), pelo método Sanger, no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ).

Após o sequenciamento, a fita líder e a fita reversa de estirpe foram utilizadas para montagem de contigs com o programa ChromasPro (Technelysium). As regiões de baixa qualidade foram removidas manualmente e os contigs avaliados individualmente para garantir a qualidade da montagem. Os contigs formados foram submetidos à análise com o algoritmo Blastn (Altschul *et al.*, 1990) para busca de sequências de alta similaridade no banco de dados público NCBI GenBank®. A base de dados de pesquisa utilizada foi a *Nucleotide collection – (nr/nt)* com os parâmetros básicos do Blastn. As sequências foram depositadas no Genbank com os códigos MK139712 a MK139736 e MK159711.

A árvore filogenética foi gerada no programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) com as estirpes de referência obtidas no Genbank®. O melhor modelo de substituição para o cálculo das distâncias evolutivas, definido com base na análise de modelos disponibilizada no MEGA 6, foi o Tamura-Nei. O suporte estatístico para os diferentes cladogramas formados nas árvores foi calculado pela análise de amostragem *bootstrap* (Swofford *et al.*, 1996) onde o valor calculado indica a confiabilidade do agrupamento. O método utilizado foi o de máxima verossimilhança.

Experimento para avaliação da eficiência das estirpes

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, entre os meses de março e junho de 2018. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 23 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos constituíram-se das 21 estirpes de rizóbios selecionadas no ensaio de autenticação (Tabela 1), e dois controles, sendo um deles um controle nitrogenado que recebeu nitrogênio na dose 5 mg semana⁻¹ e o outro, um controle absoluto sem inoculação ou adubação com nitrogênio.

Tabela 1. Promoção do acúmulo de biomassa vegetal, eficiência e eficácia de estirpes de alfa e beta-rizóbios isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia*. Médias de 4 repetições.

Estirpe	Classificação taxonômica ¹	Localidade	Massa da parte aérea seca (g)*	Massa das raízes secas (g)*	Massa total (g)*	Eficiência	Eficácia
BR 13975	<i>P. diazotrophica</i>	Seropédica, RJ	2095 a	1755 a	3986 a	2890	97
BR 13954	<i>P. diazotrophica</i>	Juazeiro, BA	1993 a	1475 a	3567 a	2748	92
BR 13950	<i>P. diazotrophica</i>	Natal, RN	1700 ab	1663 a	3433 a	2345	79
BR 13966	<i>P. diazotrophica</i>	Juazeiro, BA	1600 a	1553 a	3236 a	2207	74
BR 13987	<i>P. diazotrophica</i>	Juazeiro, BA	1200 abc	1133 ab	2437 ab	1655	55
BR 13953	<i>P. sabiae</i>	Seropédica, RJ	1095 abc	1013 ab	2175 ab	1510	51
BR 13976	<i>P. diazotrophica</i>	Juazeiro, BA	1020 abc	928 ab	2015 ab	1407	47
BR 13993	<i>P. sabiae</i>	Mangaratiba, RJ	808 abc	705 ab	1574 ab	1114	37
BR 3407	<i>P. sabiae</i>	Seropédica, RJ	625 abc	565 abc	1237 ab	862	29
BR 13990	<i>P. sabiae</i>	Itaguaí, RJ	465 bcd	385 bd	913 bc	641	22
BR 14135	<i>P. sabiae</i>	Mangaratiba, RJ	290 cde	300 bd	625 bd	400	13
BR 14134	<i>T. symbiotica</i> **	Natal, RN	138 def	178 cde	328 cde	190	6
BR 3424	<i>P. diazotrophica</i>	Fortaleza, CE	123 def	168 cde	290 cde	169	6
BR 13992	<i>P. diazotrophica</i>	Petrolina, PE	120 def	115 df	235 cde	166	6
BR 13949	<i>P. sabiae</i>	Seropédica, RJ	105 def	163 df	268 cde	145	5
BR 13988	<i>Rhizobium sp.</i>	Mangaratiba, RJ	92.5 Ef	105 df	198 e	128	4
BR 13948	<i>P. phymatum</i>	Mangaratiba, RJ	78 Ef	73 ef	190 e	107	4
BR 13989	<i>Rhizobium sp.</i>	Itaguaí, RJ	78 Ef	105 df	183 e	107	4
BR 13994	<i>P. sabiae</i>	Mangaratiba, RJ	73 ef	58 f	160 e	100	3
BR 13947	<i>Rhizobium sp.</i>	Seropédica, RJ	53 f	170 cde	223 de	72	2
BR 13951	<i>P. sabiae</i>	Mangaratiba, RJ	45 f	118 df	163 e	62	2
TN		-	2163 a	1913 a	4104 a	2983	100
TA		-	73 f	68 ef	140 e	100	3

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ***Trinickia symbiotica*. ¹Conforme Oliveira et al. (2019).

As sementes de sabiá foram imersas em ácido sulfúrico 98% por 4 minutos para a quebra da dormência. Após, estas passaram pelas seguintes etapas para esterilização superficial: quebra da tensão superficial em álcool 70%, por 30 segundos; lavagem com água estéril; desinfestação superficial com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) concentrado por 2 minutos e, por fim, lavagem com água destilada estéril. As sementes foram pré-germinadas em placas de Petri esterilizadas contendo papel de filtro e algodão umedecido em câmara B.O.D. à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12h durante 5 dias.

As sementes pré-germinadas foram transferidas para vasos de Leonard contendo areia e vermiculita (2:1 v:v) e solução nutritiva de Norris estéreis. Cada vaso recebeu 4 sementes, as quais foram inoculadas com 1 mL de uma cultura de cada estirpe correspondente ao seu tratamento. As estirpes foram cultivadas em meio 79 líquido (Fred; Waksman, 1928) e mantidas sob agitação horizontal orbital (150 rpm) por 3 dias antes da inoculação. As plântulas foram desbastadas cinco dias após o plantio, permanecendo uma planta por vaso. O experimento foi conduzido por 90 dias, durante os quais a solução nutritiva foi repostada sempre que necessário, conforme o seu consumo pelas plantas. Após os 90 dias, as plantas foram colhidas para avaliação do acúmulo de biomassa e cálculo da eficiência e eficácia das estirpes. A parte aérea, as raízes e os nódulos foram separados e secos em estufa a 65°C até peso constante. A eficiência e eficácia foram calculadas com as seguintes fórmulas, onde a sigla MSPA se refere à massa seca da parte aérea das plantas do referido tratamento:

$$\text{Eficiência} = (\text{MSPA tratamento} - \text{MSPA controle absoluto} / \text{MSPA controle absoluto}) * 100$$

$$\text{Eficácia} = (\text{MSPA tratamento} - \text{MSPA controle nitrogenado} / \text{MSPA controle nitrogenado}) * 100$$

Os dados de massa seca da parte aérea e massa seca total foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade, no software R (R CORE TEAM, 2021), utilizando-se do pacote *easynova* (Arnhold, 2013). A análise de regressão entre a massa dos nódulos secos e a massa seca total das plantas foi realizada também no software R, utilizando-se um modelo linear e o gráfico foi plotado com o auxílio do pacote *ggplot2* (Wickham, 2016).

Resultados e Discussão

Vinte e um dos isolados foram positivos para nodulação e, portanto, tiveram sua taxonomia e eficiência simbiótica avaliadas. Estes foram classificados majoritariamente como pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*, englobando as espécies *P. sabiae*, *P. diazotrophica* e *P. phymatum* (Figura 1 e Tabela 1). Apenas três estirpes foram classificadas como *Rhizobium* e uma como *Trinickia symbiotica*. A eficiência dessas estirpes apresentou uma grande amplitude, sendo que a maioria delas apresentou algum grau de eficiência, isto é, foram capazes de nutrir a planta com nitrogênio em diferentes níveis (Tabela 1). Contudo, apenas seis estirpes apresentaram eficácia acima de 50%, ou seja, foram capazes de garantir que as plantas acumulassem pelo menos 50% da biomassa acumulada pelo controle nitrogenado. Dentre elas destacam-se as estirpes BR 13975, BR 13954, BR 13950 e BR 13966, que promoveram acúmulos de biomassa total estatisticamente comparáveis ao do controle nitrogenado. A eficiência e eficácia dessas estirpes variaram entre 2890% e 2207% e 97% e 74%, respectivamente. Embora sejam de origem diversa, todas pertencem à espécie *P. diazotrophica* (Tabela 1). Seu desempenho também foi superior ao da estirpe tipo da espécie *P. sabiae*, BR 3407, e que foi isolada de nódulos de *M. caesalpinifolia* (Chen *et al.*, 2008; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021). Ainda assim, algumas estirpes de *P. sabiae* também apresentaram relativa eficiência e eficácia (Tabela 1).

A espécie *T. symbiotica*, anteriormente classificada no gênero *Paraburkholderia* (Estrada de Los Santos *et al.*, 2018), foi capaz de induzir a formação de nódulos. Contudo, sua eficiência e eficácia foram muito reduzidas, ao ponto das plantas com ela inoculadas não se diferirem estatisticamente do controle absoluto em termos de acúmulo de biomassa. Já as estirpes de *Rhizobium* sp. não nodularam o sabiá nos vasos de Leonard, demonstrando sua preferência por nodular com β -rizóbios nas condições dos solos estudados. O maior acúmulo de massa seca total foi altamente correlacionado com a massa dos nódulos e, novamente, as estirpes de *P. diazotrophica* supracitadas se destacam nessa correlação (Figura 2).

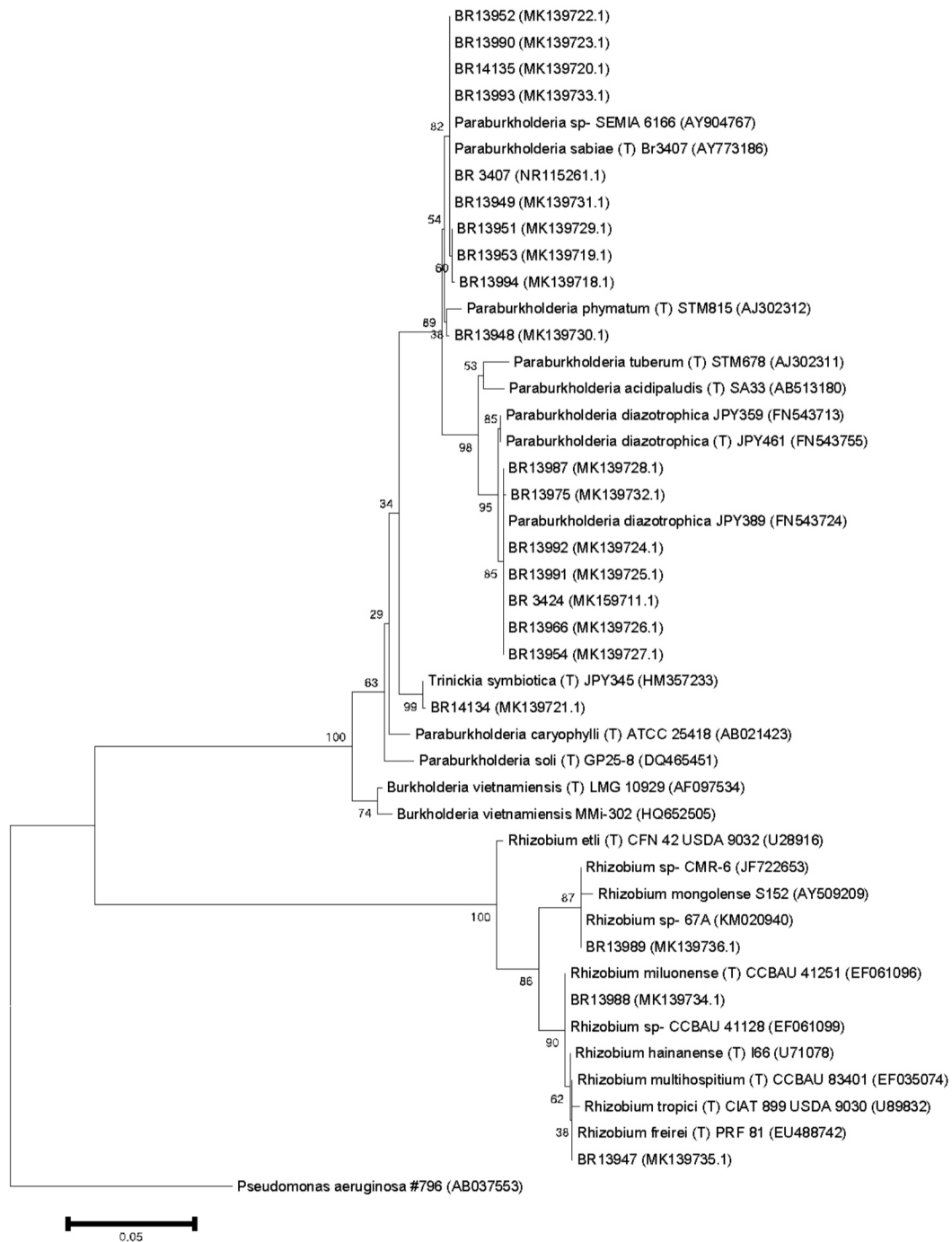


Figura 1. Árvore filogenética baseada em seqüências do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. inoculadas com solo de municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o de Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura-Nei. *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada como grupo externo para enraizar a árvore. Os números nos nós representam o suporte da análise de *bootstrap*. Os códigos de acesso de cada seqüência são apresentados entre parênteses. Adaptada de Oliveira *et al.* (2019).

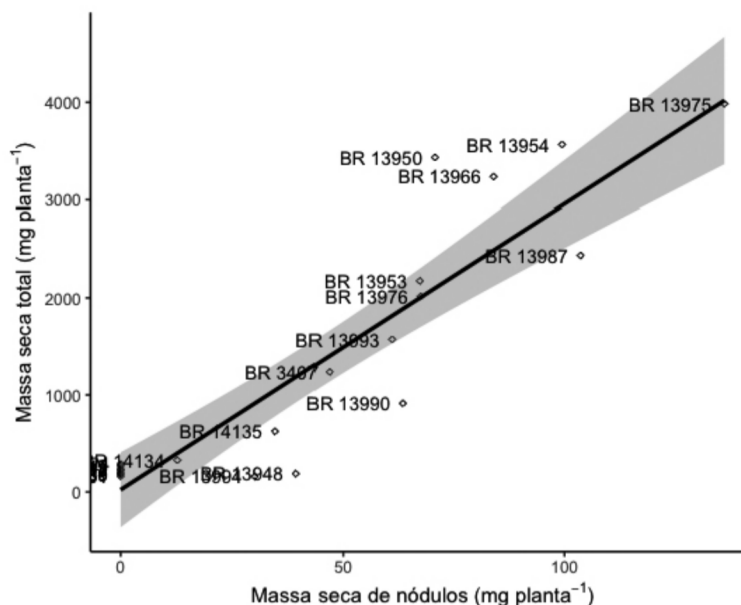


Figura 2. Correlação entre a massa seca de nódulos e a massa seca total de plantas de sabiá (*M. caesalpinifolia*) inoculadas com estirpes de rizóbios isoladas a partir de solos de diferentes localidades do Nordeste e Sudeste do Brasil. A área sombreada representa o intervalo de confiança a 95% de probabilidade. A equação da curva de regressão é a $y = 23.725 + 29.349x$ (R^2 ajustado = 0.8257, $p < 0.001$), onde y e x são as massas seca total e de nódulos, respectivamente.

As β -proteobactérias desempenham um papel fundamental na fixação de nitrogênio em associação com plantas do gênero *Mimosa* (Chen *et al.*, 2005; Elliot *et al.*, 2009; Gyaneshwar *et al.*, 2011; Bontemps *et al.*, 2010; Reis Junior *et al.*, 2010). Sua capacidade de induzir a formação de nódulos e fixar N_2 em simbiose com espécies desse gênero foi descoberta por Moulin *et al.* (2001) e Chen *et al.* (2001), os quais isolaram, respectivamente, bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus*. As primeiras descrições levantaram dúvidas sobre seu potencial de patogenicidade. Porém, várias espécies isoladas de nódulos de leguminosas foram reclassificadas no gênero *Paraburkholderia* com base em evidências de que essas espécies não são patogênicas (Estrada de Los Santos *et al.*, 2015). Da mesma forma, *Ralstonia taiwanensis*, cujo gênero também possui espécies fitopatogênicas, foi reclassificada no gênero *Cupriavidus* (Amadou *et al.*, 2008). Estas bactérias foram então denominadas β -rizóbios para diferenciá-las dos até então conhecidos α -rizóbios (Dall'agnol, 2016).

Os resultados aqui apresentados confirmam a preferência de *M. caesalpinifolia* por *Paraburkholderia*, sua efetividade simbiótica e que as bactérias desse gênero são uma fonte potencial de inoculantes para a espécie. De fato, as estirpes selecionadas para o sabiá já na década de 1980, como a estirpe BR 3407, são hoje classificadas como *Paraburkholderia* (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021). Contudo, isso foi descoberto muito posteriormente após os avanços na biologia molecular e na taxonomia bacteriana (Chen *et al.*, 2005; 2008). O isolamento de rizóbios não simbióticos do gênero *Rhizobium* a partir de nódulos, como observado aqui, pode ser explicado pela coinfecção, que permite sua entrada conjuntamente com estirpes efetivas conforme demonstrado por Zgadzaj *et al.* (2015) e Gano-Cohen *et al.* (2016). Ainda assim, há relatos de outras espécies de *Mimosa* nodulando com *Rhizobium*, como foi o caso de Bontemps *et al.* (2010) e Reis Junior *et al.* (2010) que mostraram que *Mimosa xanthocentra* Mart., endêmica do Cerrado e Caatinga, se associou a *Rhizobium* de forma preferencial em solos nativos. Segundo Bournaud *et al.* (2013) a capacidade das leguminosas de formar simbiose com o gênero *Paraburkholderia* não é antagônica à presença de α -rizóbios, uma vez que eles também encontraram os dois tipos de simbioses em seis espécies do grupo *Piptadenia*. Eles afirmam também, que as condições ambientais (especialmente as características do solo) desempenham papel crucial na sobrevivência e biogeografia dos simbioses.

Observa-se que a classificação das estirpes obedeceu a uma clara distribuição geográfica. *P. diazotrophica* foi isolada majoritariamente do Nordeste, enquanto *P. sabiae* foi isolada com maior frequência do Sudeste (Tabela 1) (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Isso indica uma adaptação das espécies às diferentes condições edafoclimáticas e corrobora resultados que mostram a diversidade dos simbioses de *Mimosa* spp. associada a fatores geográficos, como localização e altitude (Bontemps *et al.*, 2010; 2016), bem como aos atributos do solo (Pires *et al.*, 2017). Por exemplo, Pires *et al.* (2017) mostraram que em solos de baixa fertilidade e baixo pH predominavam bactérias do gênero *Paraburkholderia* e no solo caracterizado como fértil e com o pH neutro predominam bactérias do gênero *Rhizobium*.

Por fim, a preferência geográfica aqui observada parece indicar que as estirpes de *P. sabiae*, embora menos eficientes, seriam mais adaptadas a solos da região Sudeste. Contudo, uma estirpe de *P. diazotrophica*, de fato a de eficiência mais alta (BR 13975), foi isolada do Rio de Janeiro (Tabela 1),

o que pode abrir a oportunidade para a seleção de uma estirpe que atenda ambas as regiões. Até o momento, a recomendação de estirpes de rizóbio feita pelo MAPA não levam qualquer critério geográfico em consideração (Brasil, 2011). Contudo, sabe-se que um mesmo inoculante nem sempre é efetivo sob diferentes condições ambientais (Tabassum *et al.*, 2017). Assim, dois cenários são possíveis: a seleção de inoculantes adaptados para máxima eficiência em condições regionais ou a seleção de inoculantes de amplo espectro e que possam ser utilizados em diferentes localidades. A segunda opção pode ser viável para leguminosas florestais, como o sabiá, visto que o objetivo principal é o estabelecimento bem-sucedido das plantas no campo, ao contrário de leguminosas de grãos para as quais se busca a máxima produtividade (Brasil, 2011). Uma terceira possibilidade é a elaboração de inoculantes mistos, com as estirpes adaptadas a diferentes condições. Essas hipóteses e possibilidades são relevantes para guiar as futuras etapas de experimentação com as estirpes aqui selecionadas.

Conclusões

As estirpes BR 13975, BR 13954, BR 13950 e BR 13966 se destacaram como sendo as quatro mais eficientes e eficazes em simbiose com *Mimosa caesalpinifolia* e, por isso, são recomendadas para testes na etapa de seleção tipo III como inoculantes para a fixação biológica de nitrogênio. Todas pertencem à espécie *Paraburkholderia diazotrophica*, a qual predominou em solos do Nordeste, indicando uma maior frequência da espécie em solos dessa região. Ainda assim, não se pode falar numa relação entre o desempenho das estirpes e sua origem geográfica, visto que a estirpe BR 13975 foi isolada da região Sudeste.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Petrobras, à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos 0050.0098775.15.9, E-26/111.683/2021 e 475168/2012-7, respectivamente; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de Isabelly Santos Rosado

de Oliveira, Thiago Gonçalves Ribeiro e Maura Santos Reis de Andrade da Silva; e ao CNPq pela bolsa de produtividade fornecida ao pesquisador Ederson da Conceição Jesus (475168/2012-7).

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3 p. 403-410. 1990.

AMADOU, C.; PASCAL, G.; MANGENOT, S.; GLEW, M.; BONTEMPS, C.; CAPELA, D.; CARRÈRE, S.; CRUVEILLER, S.; DOSSAT, C.; LAJUS, A.; MARCHETTI, M.; POINSOT, V.; ROUY, Z.; SERVIN, B.; SAAD, M.; SCHENOWITZ, C.; BARBE, V.; BATUT, J.; MÉDIGUE, C.; MASSON-BOIVIN, C. (2008). Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. **Genome research**, v. 18, n. 9, p. 1472–1483, 2008.

ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 488-492, 2013.

BALBINO, E.; CARNEIRO, J. G. A.; BARROSO, D. G.; PAULINO, G. M.; LAMÔNICA, K. R. Crescimento inicial e fertilidade do solo em plantios puros e consorciados de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 85, p. 27-37, 2010.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B. dos; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. de F.; FARIA, S. M. de; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010

BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M. F.; MOULIN, L.; ELLIOTT, G. N.; LACERCAT-DIDIER, L.; DASILVA, C.; GREYER, R.; CAMARGO-RICALDE, S. L.; CHEN, W.; SPRENT, J. I.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, p. 319-333, 2016.

BOURNAUD, C.; FARIA, S. M. de; SANTOS, J. M. F. dos; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHANITREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (Tribe mimosae). **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-10, may, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13 de 24 de março de 2011**, Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, Brasília, DF, 2011.

CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F.; DE FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M. de ; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.,R.; ELLIOT, G. N.; SPRENT, J.I .; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. J. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461–7471, 2005.

CHEN, W. M.; LAESENS, S.; LEE, T.-M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C. YOUNG, J. P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, 2008.

DALL'AGNOL R. F. **Taxonomia e Filogenia de Alfa e Beta rizóbios provenientes de solos dos Cerrados e da Mata Atlântica**. 2016. 217f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Londrina – Londrina, PR.

ELLIOT, G. N.; CHOU, J. H.; CHEN, W. M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 762-778, 2009.

ELLIOT, G. N.; CHEN, W. M.; CHOU, J. H.; WANG, H. C.; SHEU, S. Y.; PERIN, L.; REIS, V. M.; MOULIN, L.; SIMON, M. F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J. M.; BESSI, R.; FARIA, S.M.; TRINICK, M. J.; PRESCOTT, A. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 168-180, 2007.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Núcleo de Tecnologia da Informação. **Portal Alelo**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/alelo>. Acesso em: 09 ago. 2021. EMBRAPA. Alelo Microrganismo.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; ROJAS-ROJAS, F. U.; TAPIA-GARCÍA, E. Y.; VÁSQUEZ-MURRIETA; M. S.; HIRSCH; A. M. To split or not to split an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Ann Microbiol**, v. 66, p. 1303–1314, 2015.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; PALMER, M.; CHAVEZ-RAMIREZ, B.; BEUKES, C.; STEENKAMP, E. T.; BRISCOE, L.; KHAN, N.; MALUK, M.; LAFOS, M.; HUMM, E.; ARRABIT, M.; CROOK, M.; GROSS, E.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; WHITMAN, W. B.; SHAPIRO, N.; POOLE, P. S.; HIRSCH, A. M.; VENTER, S. N.; JAMES, E. K. Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia* sensu lato Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the *Burkholderiaceae*. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 389, 2018.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897–903, 1997.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Yeast extract-manitol agar. In: FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928.

GANO-COHEN, K. A.; STOKES, P. J.; BLANTON, M. A.; WENDLANDT, C. E.; HOLLOWELL, A. C.; REGUS, J. U.; KIM, D.; PATEL, S.; PAHUA, V. J.; SACHS, J. L. Nonnodulating *Bradyrhizobium* spp. Modulate the Benefits of Legume-Rhizobium Mutualism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5259–5268, 2016.

GOMES, P. **Forragens fartas na seca**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1977, 238 p.

GUZMAN, I.; DOBEREINER, J. Effect of *Azotobacter chroococcum* and tryptophan on the inoculation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with *Rhizobium japonicum*. In: REUNIAO LATINOAMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: UFRGS, 1968. p.46-57.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; ELLIOT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276–1288, 2011.

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

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

MENDES, B. V. **Plantas das Caatingas**: umbuzeiro, juazeiro e sabiá. Mossoró: Fundação Vingt-Unt Rosado, 2001. 110 p. (Coleção Mossoroense).

MENDES, B. V. **Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)**: valiosa forrageira arbórea e produtora de madeira das caatingas. Mossoró: ESAM, 1989. 31p. (Coleção Mossoroense, 660, Série B).

MOULIN L.; MUNIVE A.; DREYFUS B.; BOIVIN-MASSON C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950. 2001.

OLIVEIRA, I. S. R.; JESUS, E. C.; RIBEIRO, T. G.; SILVA, M. S. R. de A.; TENORIO, J. O.; MARTINS, L. M. V.; FARIA, S. M. *Mimosa caesalpinifolia* Benth. adapts to rhizobia populations with differential taxonomy and symbiotic effectiveness outside of its location of origin. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 8, fiz109, 2019.

PIRES, R. C.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; ZILLI, J. E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E. K.; SIMON, M. F. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant and Soil**, v. 423, p. 411-418. 2018

R CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 21 ago. 2021.

REIS JÚNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. W.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; DE FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, p. 934–946, 2010.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R. de; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 104).

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1995. 294 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In HILLIS, D. M.; MORTIZ, D.; MABLE, B. K.; (Eds.). **Molecular Systematics**, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.

TABASSUM, B.; KHAN, A.; TARIQ, M.; RAMZAN, M.; KHAN, M. S. I.; SHAHID, N.; AALIYA, K. Bottlenecks in commercialization and future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 102-117, 2017.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

WANG, R-F.; CAO, W-W; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis of *Fuso Bacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 341-343. 1996.

WICKHAM, H. ggplot2: **Elegant Graphics for Data Analysis**. New York: Springer-Verlag, 2016.

ZGADZAJ, R; JAMES, E. K.; KELLY, S.; KAWAHARADA, Y.; DE JONGE, N.; JENSEN, D. B.; MADSEN, L. H.; RADUTOIU, S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **PLoS Genetics**, v. 11, e1005280, 2015.

Embrapa

Agrobiologia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL