



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM MANEJO DO SOLO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
DIAZOTRÓFICOS ISOLADOS DE
BRACATINGA.**

NATALIA CAROLINA MORAES EHRHARDT BROCARDI

LAGES, 2013

NATALIA CAROLINA MORAES EHRHARDT BROCARDI

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
DIAZOTRÓFICOS ISOLADOS DE BRACATINGA.**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Manejo do Solo, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Manejo do Solo.

Orientador: Julio Cesar Pires Santos

LAGES
2013

E33c Ehrhardt-Brocardo, Natalia Carolina M.
Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de
diazotróficos isolados de bracatinga / Natalia Carolina
M. Ehrhardt-Brocardo. - 2013.
66 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Julio Cesar Pires Santos
Bibliografia: p. 54-66
Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteinárias,
Programa de Pós-Graduação em Manejo do Solo, Lages,
2013.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. *Mimosa*.
3. Endofíticos. I. Ehrhardt-Brocardo, Natalia Carolina M.
II. Santos, Julio Cesar Pires. III. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Manejo do Solo. IV. Título

CDD: 631.4 - 20.ed.

NATALIA CAROLINA MORAES EHRHARDT BROCARDO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
DIAZOTRÓFICOS ISOLADOS DE BRACATINGA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Manejo do Solo,
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Manejo
do Solo.

Banca Examinadora

Orientador: _____

Dr. Julio Cesar Pires Santos
UDESC-Lages

Membro: _____

Dr^a. Cileide Maria Medeiros Coelho
UDESC-Lages

Membro Externo: _____

Dr. Murilo Dalla Costa
EPAGRI - Lages

Lages, 29 de agosto de 2013.

Aos mestres com quem aprendi ao longo da minha caminhada, Dedico.

À minha família que tanto amo, Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com a ajuda de muitas mãos. Mãos estas que orientaram, plantaram, doaram, regaram, apoiaram, colheram, ensinaram, enfim, mãos de amigos que tiveram estimável contribuição para a concretização deste resultado.

Desta forma, resta-me agradecer...

À Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinárias, pela oportunidade do acesso ao ensino de qualidade, e pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador professor Julio, um exemplo de ser humano e profissional pesquisador e educador.

À minha amiga Priscila, minha professora e co-orientadora que me iniciou nas pesquisas com diazotróficos, por toda dedicação e doação de tempo e conhecimento no acompanhamento deste trabalho.

Aos meus amigos Antonio e Luís por estarem sempre dispostos a me auxiliar sempre que precisei, seja no controle de pragas, na determinação de nitrogênio ou desvendando programas estatísticos.

Aos meus companheiros de orientação Luciana, Éverton, Silmar e Flávia pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação e bolsistas do Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo pelo tempo convívio.

Às minhas amigas Marta, Rubia, Fernanda, Greice, Maria Teresa e Camila por compartilharem comigo esta experiência desafiadora e gratificante.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal, Laboratório de Levantamento e Análise Ambiental e Laboratório de Análises de Solos pelo apoio logístico com a doação de água destilada.

Aos colegas do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, pela disponibilidade do espaço, materiais e equipamentos durante os procedimentos para a análise das amostras de tecido.

À Embrapa Agrobiologia, por intermédio da curadora da coleção de culturas de bactérias diazotróficas e outros microrganismos multifuncionais, Dr^a. Rosa Maria Pitard, que concedeu a estirpe referência utilizada no experimento.

À Universidade Federal de Santa Maria, sobretudo as pesquisadoras Zaida, Andressa e Daiana pela assistência na caracterização genética dos isolados.

Aos meus pais Paulo Henrique e Cristina por me ensinarem os valores essenciais à vida, pelo apoio constante e pelo amor incondicional, não medindo esforços para a concretização dos meus sonhos.

Ao meu irmão e amigo Matheus (Nino) por me ensinar que sorrir e manter a tranquilidade são atitudes essenciais para uma vida mais harmoniosa.

Aos meus avós Lauro e Morena, Ilmo e Cecília pelo exemplo que sempre serão para mim, de organização, amor, paciência e sensibilidade.

Aos meus padrinhos Daniel e Andréia, por me acolherem em seu lar com tanto carinho.

Ao meu marido Lucas, por todo o seu amor e ternura, entendendo e possibilitando a continuidade dos meus estudos.

RESUMO

EHRHARDT-BROCARD, Natalia Carolina M. **Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de diazotróficos isolados de bracatinga.** 2013. 66p. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo - Área: Caracterização, Conservação e Uso dos Recursos Naturais) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Manejo do Solo, Lages, 2013.

O nitrogênio é um dos macronutrientes minerais essenciais aos seres vivos, o que o torna um dos fatores limitantes para o crescimento vegetal. Apenas uma parcela dos procariotos, os diazotróficos, possui a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico para outras formas disponíveis para as plantas. A bracatinga é uma leguminosa arbórea capaz de estabelecer simbiose mutualística com organismos diazotróficos. É uma espécie de importância econômica devido ao rápido crescimento, sendo utilizada em múltiplos usos: produção de energia, madeira, forragem, indústria química de produtos naturais, apicultura, paisagismo e sombreamento, recuperação de áreas degradadas e zonas ripárias. O presente estudo objetivou caracterizar e avaliar a eficiência simbiótica dos diazotróficos que nodulam a bracatinga, estabelecendo relação entre os isolados predominantes e as condições edafoclimáticas de cada área amostral. Coletaram-se nódulos radiculares retirados ao acaso em 7 áreas compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-oeste do Estado de Santa Catarina. Foi observada ampla diversidade cultural entre os diazotróficos presentes, havendo predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, formato circular, borda lisa e superfície mucóide. Dentre os parâmetros avaliados, transparência da colônia, produção de muco e alteração do pH, foram considerados relevantes para a diferenciação dos isolados. A eficiência simbiótica foi avaliada em experimento na casa de vegetação de fevereiro a agosto de 2012. Foram realizadas quatro coletas a partir dos 120 dias após a emergência, onde se mensurou: massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR); número e massa seca de nódulos (MSN) e nitrogênio acumulado na parte aérea. Para MSPA, MSR e N acumulado, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, embora os isolados A8, A91, A92 e A52 tenham apresentado melhor capacidade e desempenho de nodulação comparados aos demais isolados e à estirpe referência, Br3454. Durante a avaliação dos isolados entre as quatro épocas de coleta, foi possível agrupá-los conforme a capacidade de incrementar a MSPA, MSR e o N acumulado. A época de coleta efetuada aos 135 dias após o plantio (E2), apresentou diferença significativa de acréscimo dos parâmetros avaliados em relação às demais épocas. A caracterização taxonômica dos isolados foi realizada por comparação na base de dados do National Center for Biotechnology Information sendo as espécies isoladas pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Mimosa*. Endofíticos.

ABSTRACT

EHRHARDT-BROCARDO, Natalia Carolina M. **Characterization and evaluation of the efficiency of symbiotic diazotrophic isolates bracatinga**. 2013. 66p. Dissertation (MSc in Soil Management - Area: Characterization, Conservation and Use of Natural Resources) - Santa Catarina State University. Postgraduate Programme in Soil Management, Lages, 2013.

Nitrogen is a macronutrient essential minerals to living beings, which makes it one of the limiting factors for plant growth. Only a portion of prokaryotes, the diazotrophs possess the ability to reduce the atmospheric nitrogen into other forms available to plants. The bracatinga is a leguminous tree able to establish mutualistic symbiosis with diazotrophic organisms. It is a kind of economic importance due to the rapid growth and is used in multiple uses: energy production, timber, fodder, chemical industry natural products, beekeeping, landscaping and shading, recovery of degraded areas and riparian zones. The present study its purpose to characterize and evaluate symbiosis efficiency of the diazotrophic nodulating bracatinga, establishing a relationship between the predominant isolates and environmental conditions of each sampling area. We collected root nodules removed at random from 7 areas between the Valley of Itajaí, Plateau South and Midwest of the State of Santa Catarina. Wide cultural diversity was observed among diazotroph present, with a predominance of isolates of rapid growth, colony color with milky white, circular, smooth edge and surface mucous. Among the parameters evaluated, transparency of the colony, mucus production and pH change were deemed relevant for the differentiation of isolates. The symbiosis efficiency was evaluated in an experiment in a greenhouse from February to August 2012. Four samples were taken from 120 days after emergence, where measured: shoot dry matter (MSPA) and root (MSR), number and dry weight of nodules (MSN) and nitrogen accumulated in shoots. For MSPA, MSR, N accumulation, no significant differences were observed between treatments, although isolated A8, A91, A92 and A52 have shown better nodulation capacity and performance compared to other isolates and the reference strain, Br3454. During the evaluation of isolates among the four collection periods, it was possible to group them according to ability to increase the MSPA, MSR and N accumulation. The collection time performed at 135 days after planting (E2), significant difference in growth parameters evaluated in relation to the other seasons. The taxonomic characterization of isolates was performed by comparison to the database of the National Center for Biotechnology Information being isolated strains belonging to the genera *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*.

Key-words: Biological Nitrogen Fixation. *Mimosa*. Endophytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Localização das áreas de coleta de nódulos radiculares de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) de diferentes condições edafoclimáticas..... 30
- Figura 2 - Dendrograma de Similaridade entre os diazotróficos, gerado pelo aplicativo computacional PAST (HAMMER et al., 2001) utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard. Formação de grupos com base em parâmetros culturais ao nível de 70% de similaridade. 39
- Figura 3 - Distribuição dos isolados de diazotróficos de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) entre os gêneros, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Análises de solo das áreas de coleta de nódulos radiculares de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). O item “Solo” refere-se à análise de solo utilizado para experimento em Casa de Vegetação..... 31
- Tabela 2 - Denominação atribuída aos diazotróficos isolados das 7 áreas de coleta compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-oeste do Estado de Santa Catarina..... 32
- Tabela 3 - Características culturais e morfológicas dos diazotróficos nodulantes em *Mimosa scabrella* Benth. nativos de diferentes ambientes edafoclimáticos..... 38
- Tabela 4 - Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e nitrogênio acumulado na MSPA (N acum.) entre os tratamentos. 42
- Tabela 5 - Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e nitrogênio acumulado na MSPA (N acum.) por épocas de coleta (E1, E2, E3, E4) em cada tratamento.....433

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.	O Bioma Mata Atlântica e a Espécie <i>Mimosa scabrella</i> Benth.....	13
2.2.	O Nitrogênio nos Ecossistemas Terrestres e a FBN.....	17
2.3.	Interação e Avaliação da Eficiência Simbiótica.....	18
2.4.	A FBN e os Fatores Competitividade e Condições Edafoclimáticas.....	20
2.5.	Caracterização Cultural e Morfológica e Caracterização Genética.....	22
2.6.	Espécies de Diazotróficos em Simbiose com o Gênero <i>Mimosa</i>	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1.	Coleta, Isolamento e Caracterização Morfológica de Diazotróficos.....	27
3.2.	Avaliação da Eficiência Simbiótica na FBN.....	33
3.3.	Caracterização Genética dos Isolados de Diazotróficos.....	35
3.4.	Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1.	Caracterização Cultural e Morfológica dos Diazotróficos.....	36
4.2.	Avaliação da Eficiência Simbiótica na FBN.....	40
4.3.	Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos.....	44
5	CONCLUSÃO.....	53
6	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies arbóreas de interesse econômico são conhecidas dentro da família Leguminosae (Fabaceae). A enorme quantidade de espécies contidas neste grupo possibilita uma diversidade de exploração, sendo importantes, por exemplo, para a produção de celulose e papel, energia, forragem, adubação verde, madeira, alimento, sombreamento e recuperação de áreas degradadas (AUER; SILVA, 1992). Algumas espécies pertencentes à família Leguminosae apresentam a capacidade de estabelecer simbiose mutualística com microorganismos do solo, notadamente com as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico.

A família Leguminosae é significativa em todos os ecossistemas tanto em número de espécies como de indivíduos. Apesar de muitas espécies ocorrerem em diferentes regiões/ecossistemas, existe um alto nível de endemismo. Estima-se que no Brasil existam pelo menos 2.000 espécies de Leguminosae, cerca de 10% do total de espécies de leguminosas do planeta. Dos ecossistemas mais preservados até os mais perturbados, a frequência de espécies de Leguminosae em relação ao número total de espécies é geralmente elevada. Apesar de ser uma família que apresenta espécies de alta capacidade de nodulação, nem todas as leguminosas são nodulíferas (MOREIRA, 2008). Por meio dos levantamentos em várias partes do mundo, estima-se que cerca de 88% das 5.000 espécies analisadas até o momento possuem capacidade de nodulação, sendo que as espécies nodulíferas são a maioria das Mimosoideae e Papilionoideae, mas representam uma parte das espécies de Caesalpinioideae (MOREIRA et al., 2013).

A bracatinga, *Mimosa scabrella* Benth., é uma leguminosa arbórea que ocorre desde São Paulo até o Rio Grande do Sul, em regiões de altitudes na floresta de pinhais. De grande porte quando adulta, é uma espécie pioneira bastante indiferente quanto às condições físicas e químicas do solo. É característica e exclusiva das matas de pinhais, onde sua utilização é ampla. Como planta pioneira de rápido crescimento, a madeira serrada é empregada na construção civil para acabamentos internos, compensados e caixotaria, na recuperação de áreas degradadas e na silvicultura. A árvore é bastante ornamental, podendo ser manejada para o paisagismo e sombreamento e ainda para a produção de mel (LORENZI, 2000).

A necessidade de se incluir o uso de essências nativas no programa de reflorestamento brasileiro estimulou a pesquisa sobre processos

microbiológicos, essencialmente a fixação biológica de nitrogênio, associados à essas plantas e que permitem o seu estabelecimento a baixo custo (AUER; SILVA, 1992). Devido à alta eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio, pesquisas que incrementem as informações sobre a fixação em espécies arbóreas permitem uma redução significativa dos custos energéticos e financeiros, quando comparados com a utilização de adubos minerais, uma vez que consiste em uma alternativa que preconiza a manutenção do equilíbrio dinâmico dos ecossistemas.

Neste trabalho discorreremos temas do Manejo do Solo que aperfeiçoaram nosso conhecimento a partir da pesquisa científica aplicada a microbiologia agrícola, fixação biológica de nitrogênio em leguminosas arbóreas e riqueza de espécies de bactérias nodulíferas.

O presente estudo objetivou estabelecer relação entre a diversidade cultural e morfológica e a variabilidade genética dos isolados nodulantes em bracatinga nos diferentes ambientes edafoclimáticos, bem como, avaliar a eficiência simbiótica entre os isolados nativos e a estirpe de referência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Bioma Mata Atlântica e a Espécie *Mimosa scabrella* Benth.

A Mata Atlântica é formada por vários ecossistemas diferentes que compõe uma grande diversidade de paisagens. Apesar de originalmente formar uma floresta contínua, entremeada por ecossistemas associados como manguezais, restingas e campos de altitude, até recentemente existiam diferentes denominações para a Mata Atlântica. Essas denominações eram baseadas em correntes que agrupavam as formações florestais e ecossistemas associados de acordo com seus próprios critérios. Quando a Constituição Federal de 1988 conferiu à Mata Atlântica o status de Patrimônio Nacional, a definição de quais áreas compõe o domínio da Mata Atlântica passou a ser preponderante para a política de conservação. De acordo com a norma legal Lei nº 11.428/2006, fazem parte do Domínio Mata Atlântica as seguintes formações florestais nativas e ecossistemas associados: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; Campos de Altitude; Áreas das Formações Pioneiras, conhecidas como manguezais, restingas, campos salinos e áreas aluviais; Refúgios Vegetacionais; Áreas de Tensão Ecológica; Brejos Interioranos e Encraves Florestais, representados por disjunções de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual; Áreas de Estepe, Savana e Savana-estépica; e vegetação nativa das ilhas costeiras e oceânicas (PROCHNOW, 2008).

As condições ecológicas e biogeográficas da Floresta Ombrófila Densa e da Floresta Ombrófila Mista são inteiramente diversas e não podem ser tomadas como uma unidade única. Fatores climáticos, geomorfológicos, geológicos, ecológicos e biogeográficos diferenciam as tipologias florestais e criam ambientes diferentes, desde a flora à fauna. A própria ocupação da terra é diferente nestas comunidades - pequenas propriedades nos morros cristalinos e grandes propriedades no Planalto. São, portanto, ecossistemas diferentes na sua origem e no seu desenvolvimento. De acordo com Veado (1999), “Planalto das Araucárias” é a denominação dada por Almeida (1956) para designar as terras do centro e do oeste de Santa Catarina. A sucessão, iniciada na restinga, atinge o seu grau de máxima complexidade no Planalto. A mata de *Araucaria angustifolia* é substituída por espécies subtropicais e tropicais,

simultaneamente à expansão do pinheiro sobre os campos. Conforme Veado (1999), os Campos de Altitude foram moldados em derrames de lavas ácidas cretácicas. Os solos são pobres, mal drenados, rasos, litólicos, com elevada lixiviação (distróficos e álicos). São relictos de um clima semi-árido e frio. Foram distinguidos três períodos na ocupação dos Campos: 1) usados como pastos naturais e de que restam poucos vestígios, com uso intensivo do fogo; 2) melhoramento dos pastos com a introdução de gramíneas resistentes ao frio e ao pisoteio, com uso intensivo do fogo e 3) intensificação da agricultura (mecanização, fertilizantes e defensivos), baixo custo das terras de campo e a continuidade do uso do fogo. Os pinheiros são senescentes, agigantados e a sua densidade começa a diminuir consideravelmente quando a Floresta Ombrófila Mista vai, aos poucos, sendo substituída.

Presente nos grupos vegetacionais do domínio Mata Atlântica descritos, a espécie *Mimosa scabrella* Benth. que é detentora de vários nomes populares, desde anizeiro em Minas Gerais, bracatinho ou mandengo no Rio de Janeiro, braacatinga, maracatinga, bracatinga-branca e bracatinga-preta no Paraná e em Santa Catarina ou apenas bracaatinga no Rio Grande do Sul, é conhecida pelo seus múltiplos usos na economia atual. Para Hoehne (1933)¹, o nome popular “bracatinga” é derivado do nome guarani *Abaracaatinga*, o qual é composto pelos termos “aba” (muito, abundante), “ra” (penas ou plumas), “caa” (arvore, mata) e “tinga” (branca). Portanto, o nome indígena caracteriza a bracatinga como uma árvore (ou mata) branca de muitas plumas. Carvalho (1994) aponta que esta espécie pertence a família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, e possui duas variedades botânicas - *Mimosa scabrella* var. *scabrella*, com floração no inverno e *Mimosa scabrella* var. *aspericarpa* (bracatinga-argentina) com floração na primavera-verão, sendo aquela mais comum e mais frequentemente manejada ou cultivada em bracatingais. Sua área de ocorrência natural está compreendida nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Conforme Carvalho (1994), situa-se preferencialmente em altitudes entre 400 e 1.800 metros com clima temperado úmido e, em menor extensão em clima subtropical úmido e subtropical de altitude. Em relação ao tipo de solo, está presente em solos pobres e ácidos, com pH entre 3,5 e 5,5, de textura franca a argilosa e bem drenados.

¹HOEHNE, F.C., 1933 apud STEENBOCK et al., 2011.

A bracatinga é uma espécie pioneira de grande aptidão para a colonização de áreas abertas, bem iluminadas, como terrenos queimados e margens de estradas. É fortemente heliófila em todas as fases de desenvolvimento. No interior de florestas, regenera-se principalmente em áreas de distúrbio, como clareiras ou estradas internas. É comum em formações secundárias de Floresta Ombrófila, apresentando ciclo de vida relativamente curto, aproximadamente 30 anos (CARPANEZZI et al., 1988). Isto a caracteriza como sendo uma espécie R estrategista (ODUM, 1988), ou seja, que prioriza a reprodução, via elevada produção de sementes, como estratégia de sobrevivência da espécie a longo prazo.

Entre as leguminosas florestais, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* são as que apresentam maior número de espécies com sementes dormentes. Em muitas espécies dessas subfamílias, o tegumento impermeável impede a absorção de água e impõe uma restrição mecânica ao crescimento do embrião, que retarda o processo germinativo. As sementes de bracatinga possuem dormência tegumentar, podendo ser superada em ambientes naturais pelo aquecimento solar ou fogo. Para Carpanezi et al. (1988), a expansão natural da bracatinga depende, fundamentalmente, destes agentes que superem a dormência das sementes. Deste modo, o fogo é uma ferramenta na propagação e ocupação de novas áreas. Sob árvores isoladas de bracatinga, em terrenos queimados, há germinação maciça de sementes, formando pequenos grupos densos que, com a repetição do processo, expandem sua área. O sistema tradicional de produção de bracatinga baseia-se na regeneração natural pela queimada de resíduos da exploração florestal. Incêndios florestais permitem a formação de áreas densas de bracatinga, pela germinação de sementes dormentes, presentes no solo. Temperaturas a partir de 40°C são suficientes para aumentar, significativamente, a germinação. Assim, a insolação tem a capacidade de superar a dormência das sementes, pelo aquecimento do solo ou, diretamente, das sementes expostas pelas capinas ou outros agentes. As temperaturas mais eficazes para a superação de dormência situam-se entre 40°C e 80°C (BIANCHETTI, 1981; ZANON, 1988; ARAZETTI; SCOTI, 2010).

Para Bianchetti (1981), temperaturas próximas ou acima de 100°C, por alguns minutos, podem acarretar na perda parcial ou total da viabilidade das sementes. Para a superação da dormência visando a obtenção de mudas ou semeadura direta, são geralmente usados dois métodos: imersão em água a 80°C, deixando-se esfriar até atingir a temperatura ambiente (por 18 horas) ou imersão em ácido sulfúrico concentrado. O poder germinativo das

sementes chega a 90% e a germinação ocorre entre cinco e trinta dias após a semeadura.

No campo a queimada é desuniforme, existindo locais onde a temperatura do solo será maior. No sistema tradicional, as capinas das culturas agrícolas intercalares constituem um elemento acelerador da germinação, expondo sementes de bracatinga das camadas mais profundas. Assim, Carpanezzi et al. (1988) estimam que sementes depositadas até, aproximadamente, 6 cm no solo são capazes de emergir após superação de sua dormência.

Segundo Carvalho (1981), a rusticidade e as características de ser uma espécie heliófita, perenifólia e pouco exigente quanto às condições físicas e químicas do solo, proporcionam rápida cobertura de áreas de solos alterados ou degradados em que suas populações ocorrem. Regensburger et al. (2008) trazem a utilização da espécie para recuperação de áreas degradadas por atividade antrópica como a mineração, sendo observado que a bracatinga, durante o seu desenvolvimento, auxilia no sombreamento e proteção do solo. Em 1983, um ano depois da bracatinga ter sido introduzida para sombra de cafezais na Costa Rica, seu rápido crescimento inicial despertou grande interesse entre agricultores da região de San Ramón. Isto criou a necessidade da investigação de tipos de manejo para adequar o desenvolvimento e a forma das árvores segundo as exigências do café (CARPANEZZI et al., 1988).

A potencialidade de usos da bracatinga, bem como as técnicas de cultivo e manejo da espécie, datam de quase um século e são mencionadas por Steenbock et al. (2011a). As características como o rápido crescimento e elevada produtividade em altas densidades, fazem da bracatinga uma espécie que apresenta múltiplas possibilidades de uso. Na região noroeste do planalto catarinense, o manejo de bracatingais é responsável por praticamente metade da renda financeira (49,1%, em média) dos agricultores em assentamentos de reforma agrária, principalmente para a produção de lenha e carvão (STEENBOCK et al, 2011b). A madeira pode ser utilizada para vigamentos, escoras para a construção civil, móveis, caixotaria, embalagens leves, compensados, laminados e aglomerados (CARVALHO, 1994). Conforme Steenbock et al. (2011a) é possível a utilização das folhas para forragem, sobretudo nos períodos frios, uma prática já implementada por agricultores no noroeste do planalto catarinense. Lorenzi (2002) aponta que a árvore é bastante ornamental podendo ser empregada com sucesso no paisagismo.

Comparada com outras espécies arbóreas de ocorrência natural na Floresta Ombrófila, a bracatinga apresenta floração relativamente precoce. Esta característica confere sua aptidão apícola de grande significado para o fornecimento de recursos tróficos e sobrevivência das populações da entomofauna. Campos et al. (2003) citam a visitação de *Apis mellifera* ao caule de árvores de bracatinga coletando excreções de colônias de cochonilhas que ali se estabelecem. Definem ainda que o mel é um produto natural fabricado a partir do néctar das flores (mel floral) e de secreções de partes vivas das plantas, ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas (melato). No caso da bracatinga, o melato seria a fonte alternativa de alimento para estes organismos polinizadores. Em Santa Catarina, o mel de melato do caule da bracatinga é produzido de dois em dois anos, época que corresponde ao ciclo da cochonilha. No trabalho de Martins (2005) é complementado que a produção de melato produzido ao longo do tronco da árvore é resultante da atividade de insetos da ordem Homoptera (gênero *Tachardiella*), sugadores do floema vegetal. Esse autor esclarece ainda que a taxa de excreção e a disponibilidade de melato são influenciadas por variantes climáticas como umidade e temperatura. Com isso, o melato da bracatinga proporciona um incremento na produtividade mesmo em um período com escassez de recursos florais.

Esta espécie ainda é selecionada pelo potencial uso na indústria de produtos naturais. Petkowicz et al. (2011) descrevem a utilização de sementes de bracatinga para a obtenção de galactomananas, polissacarídeos hidrossolúveis que apresentam propriedades espessantes e diversas aplicações biológicas e industriais. Ono et al. (2003) relatam que na indústria farmacêutica, galactomananas extraídas de bracatinga são avaliadas quanto sua propriedade antiviral para a febre amarela (estirpe BeH111) e a dengue (estirpe Hawaii).

A bracatinga é uma espécie arbórea que apresenta capacidade de estabelecer simbiose mutualística com microrganismos do solo, notadamente com os fixadores de nitrogênio, sendo uma característica desejável para uma espécie com significativo número de usos.

2.2 O Nitrogênio nos Ecossistemas Terrestres e a FBN

Dentre os macronutrientes minerais essenciais aos vegetais, o nitrogênio é um dos mais limitantes para o crescimento vegetal e, por consequência, para os sistemas produtivos. Na biosfera o nitrogênio está presente sob diversas formas: nitrogênio molecular (N_2), íons de nitrato

(NO₃), amônia (NH₃) ou incorporado em compostos orgânicos nitrogenados (DROZDOWICZ, 1997). O grande reservatório de nitrogênio é a atmosfera terrestre, da qual 78% corresponde ao N₂. Embora a atmosfera apresente uma elevada quantidade em sua composição, a maioria dos seres vivos não tem capacidade de utilizá-lo prontamente para a constituição de seus aminoácidos e outras substâncias orgânicas (RAVEN et al., 2001). Para Hungria et al. (2001), as principais formas de disponibilização do nitrogênio às plantas são: 1) o solo, por meio da decomposição da matéria orgânica, contudo, com rápido esgotamento desta fonte natural pela sobre-exploração com os cultivos; 2) os fertilizantes nitrogenados, representando a forma de assimilação mais simples, mas com um significativo custo econômico e ambiental; 3) a fixação não-biológica, resultado de processos naturais, principalmente de descargas elétricas, combustão e vulcanismo e 4) a fixação biológica de N₂, sendo a principal via de incorporação do N à biosfera.

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é o processo pelo qual o N₂ atmosférico é transformado em amônia (NH₃), ficando disponível para compostos contendo carbono, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas nitrogenadas. Esta reação é catalisada pela enzima nitrogenase, a qual é encontrada em um número limitado de espécies de microorganismos, os diazotróficos. Os organismos fixadores de nitrogênio ou diazotróficos podem ser classificados de acordo com o modo de vida ou nutrição em: não simbióticos ou de vida livre e os que vivem em associação simbiótica com algumas espécies de plantas vasculares (RAVEN et al., 2001). Em associação simbiótica, os diazotróficos podem ser encontrados: 1) na rizosfera; 2) endofiticamente associados, principalmente com gramíneas, ou 3) estabelecendo simbiose regulada genética, bioquímica e morfológicamente do tipo mutualística (MOREIRA, 2008).

2.3 Interação e Avaliação da Eficiência Simbiótica

A seleção de novas estirpes bacterianas capazes de fixar N₂ quando em simbiose com leguminosas, é uma ferramenta importante na busca de um par simbiótico mais eficiente. Contudo, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo. Isto decorre, dentre outros fatores, da competição com a população nativa e estabelecida do solo e da baixa adaptação às condições ambientais locais (SOARES et al., 2006a, 2006b). Straliozzo e Rumjanek

(1999) complementam e corroboram que a combinação favorável dos vários fatores bióticos e abióticos presentes no ecossistema em estudo vai determinar o sucesso da inoculação, sendo que é necessário partir do conhecimento das características do microorganismo a ser introduzido, notadamente sua adaptabilidade e capacidade competitiva.

A nodulação é um processo de múltiplas etapas que envolve a leguminosa específica e a expressão gênica bacteriana (HUNGRIA; STACEY, 1997). Conforme Straliozzo e Teixeira (2000), para que ocorra a formação do nódulo é necessário que haja uma perfeita interação entre a planta e a bactéria durante uma série de etapas sequenciais. Esta interação é mediada por sinais moleculares exsudatos por ambos parceiros, os quais resultam na ativação dos genes envolvidos na simbiose. Para Mercante et al. (2000; 2002), na etapa inicial desta comunicação molecular entre macro e microssimbiontes, as plantas hospedeiras exsudam substâncias, incluindo-se carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides e isoflavonóides), que atuam não apenas como quimioatratantes para a bactéria, mas também como indutores dos genes da nodulação - nod /nol /noe, referidos coletivamente como nod. Uma vez ativados, esses genes da nodulação promovem no microssimbionte a síntese de outros sinais, chamados “fatores Nod”. Esses sinais da bactéria produzidos em resposta aos indutores presentes nas sementes e raízes das espécies são responsáveis pelas alterações morfológicas nas raízes, durante a pré-infecção, como o encurvamento do pêlo radicular, a divisão das células corticais e a indução do meristema do nódulo. Após estas etapas iniciais, as bactérias aderem-se aos pêlos radiculares, penetram na raiz do hospedeiro e inicia-se a formação do nódulo. Straliozzo e Teixeira (2000) colocam que a bactéria continua seu crescimento até sofrer uma série de transformações morfogenéticas que resultam na diferenciação dos bacteróides, capazes de fixar o nitrogênio em amônia, no interior do nódulo. Taiz e Zeiger (2004) colocam que o complexo enzimático da nitrogenase é o responsável pelo processo de fixação biológica de nitrogênio, sendo que é formado por duas unidades protéicas, a Ferro-Proteína (Fe-Proteína) e a Molibdênio-Ferro-Proteína (MoFeProteína). Assim, a planta assimila a amônia formando aminoácidos e em troca fornece os carboidratos provenientes de sua atividade fotossintética para a bactéria.

Mercante e Franco (2000), estudando o estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*, constataram que com a adição dos exsudatos das sementes, houve aumento significativo na nodulação da

planta. Verificaram ainda, que a mistura de exsudatos de sementes de feijoeiro e de *M. flocculosa* promoveu aumentos significativos na expressão dos genes da nodulação, tanto de estirpes de *Rhizobium tropici* como de *Rhizobium etli*.

Com isso, demonstra-se que para a obtenção de estirpes que otimizem o potencial de fixação de nitrogênio em leguminosas deve-se levar em conta, além da eficiência da estirpe, características como capacidade de competir com estirpes nativas por sítios de infecção, maior estabilidade genética, maior tolerância a estresses (formação de nódulos sob ampla faixa de temperatura e umidade nas raízes) e habilidade de sobreviver e se reproduzir no solo, mesmo na ausência do hospedeiro (HUNGRIA; STACEY, 1997).

2.4 A FBN e os Fatores Competitividade e Condições Edafoclimáticas

O processo de FBN está sujeito a uma série de estresses, cada um potencialmente limitante, os quais determinam o sucesso das espécies e de suas associações com organismos superiores em cada ambiente. A eficiência dos microorganismos diazotróficos em fixar nitrogênio depende, entretanto, tanto de fatores genéticos dos microorganismos e do macrossimbionte, como da interação destes com os fatores ambientais.

Conforme Hungria et al. (1997), as estirpes de rizóbios, para poder expressar sua capacidade de fixação de nitrogênio nas plantas, dependem tanto de fatores intrínsecos do processo de simbiose bactéria-leguminosa, quanto de fatores ambientais que afetam a sobrevivência da planta e da bactéria. Dentre os fatores mais relevantes, destacam-se a efetividade e a competitividade das estirpes presentes no solo e as condições ambientais. Em estudos envolvendo o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), já foram relatados diversos fatores da bactéria que estariam envolvidos na maior capacidade competitiva, como a maior mobilidade no solo, capacidade quimiotática em direção aos exsudatos da planta, taxa de crescimento em substratos de solos, a presença de determinados polissacarídeos da superfície celular, a produção de toxinas, a velocidade de infecção das raízes. No caso do feijoeiro, o genótipo da planta também pode alterar a competitividade da bactéria, pela seleção de determinadas estirpes. Esta autora coloca ainda que, diversos estudos tem mostrado que plantas em simbiose são mais suscetíveis aos fatores ambientais do que as plantas recebendo N mineral. Isso ocorre porque estão envolvidas as suscetibilidades da planta, da bactéria e da simbiose.

Na simbiose das leguminosas com os diazotróficos, o nódulo representa um abrigo para a bactéria. Porém, ao se tornar parte do sistema simbiótico, o diazotrófico passa a ser afetado por qualquer fator que diminua o vigor da planta, como por exemplo, deficiências nutricionais.

Para Franco e Neves (1992), dos nutrientes minerais, o N é o que tem maior efeito sobre a FBN. É importante salientar que só há fixação de nitrogênio em situações de deficiência deste elemento. Por outro lado, é necessário que haja disponibilidade de nitrogênio combinado para o crescimento da bactéria até o início do processo de fixação. Os estresses do solo não se limitam à disponibilidade de nitrogênio. Sugere-se que os solos tropicais apresentam problemas de erosão, de estresse hídrico, de compactação, de salinidade, de acidez e de deficiência de fósforo. Outros nutrientes tornam-se deficientes, principalmente a partir da correção do solo como, por exemplo, o zinco, após a calagem e adubação fosfática, e o potássio, enxofre e molibdênio, após alguns anos de cultivo. De uma maneira geral, plantas dependentes da FBN são mais sensíveis aos estresses do solo do que plantas adubadas com N mineral.

A maioria das espécies tropicais são tolerantes a níveis relativamente altos de acidez (pH 4,5-4,8), podendo se destacar o caupi, como produtora de grãos, e a bracatinga, como espécie arbórea importante para a recuperação de solos erodidos no sul do país. A ausência de nodulação em condições de acidez pode ser causada tanto pela acidez em si, como pela deficiência de Ca, uma vez que tanto a adição de Ca, como a exposição temporária das raízes inoculadas a pH 5,5 proporcionam aumento na produção de nódulos. Depois de formados, a atividade dos nódulos é afetada em menor intensidade pela acidez (FRANCO; NEVES, 1992). Bala et al. (2003) estudando a relação da nodulação de leguminosas arbóreas com os aspectos ecológicos de populações nativas de rizóbio em solos tropicais, constatou que a eficiência simbiótica não teve qualquer relação com parâmetros específicos do solo, porém, a quantidade e a diversidade genética entre as populações de rizóbios foi altamente afetada pela acidez do solo. De acordo com Hungria et al. (1997), a competitividade das bactérias é influenciada pelos fatores abióticos do solo, que podem afetar tanto a população nativa do solo como as condições para o estabelecimento de novas estirpes. Tem sido atribuído à acidez do solo um papel relevante na competitividade, havendo algumas evidências de que a dominância das espécies de determinados solos esteja relacionada ao seu pH.

Para Franco e Neves (1992), o desenvolvimento de qualquer ser vivo apresenta um ponto ótimo para temperatura, umidade e oxigênio. A

variação em qualquer um desses fatores terá efeito direto ou indireto sobre o desenvolvimento dos organismos afetando o processo de fixação de nitrogênio. O funcionamento da simbiose bactéria-leguminosa é, entretanto, mais sensível a extremos de temperatura do que a planta adubada com N mineral. Temperaturas baixas retardam a infecção e formação de nódulos, enquanto que em temperaturas altas, os nódulos se formam, mas são ineficientes.

Nas associações envolvendo leguminosas, a deficiência hídrica diminui a infecção dos pêlos absorventes pela bactéria, chegando até a inibir completamente a produção de nódulos. A redução do potencial hídrico no solo também tem efeito direto na atividade de fixação de nitrogênio, principalmente através da diminuição dos produtos da fotossíntese. Após o estresse hídrico, nódulos de crescimento indeterminado (nódulos alongados) podem reiniciar o crescimento e a atividade imediatamente, enquanto os nódulos de crescimento determinado, dependendo da intensidade do estresse, senescem, e novos nódulos tem que ser formados. Da mesma forma, os nódulos da maioria das leguminosas não toleram excesso de umidade por tempo prolongado, devido à necessidade de oxigênio, necessário aos processos geradores de energia. Para compensar a pouca disponibilidade de oxigênio, os nódulos aumentam os espaços vazios internamente e aumentam externamente as lenticelas, que são expansões das células epidérmicas que proporcionam maior superfície para trocas gasosas (FRANCO; NEVES, 1992).

2.5 Caracterização Cultural e Morfológica e Caracterização Genética

O estudo da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas tem aplicações agrícolas importantes. Em termos de manejo cultural, visa promover a sobrevivência de populações mais eficientes e específicas, e a obtenção de genótipos mais adaptados aos tipos de solo e tolerantes aos diferentes estresses ambientais.

A avaliação da biodiversidade presente no solo é limitada por inúmeras dificuldades, começando pelos entraves na amostragem e extração da biota do solo. Qualquer distúrbio na amostra de solo modifica as condições estabelecidas nos microagregados onde se alojam os microorganismos, notadamente as bactérias.

Para Stralioetto (2005a), estima-se que 1% da população presente no solo pode ser recuperada pelos métodos convencionais de isolamento, em virtude das limitações nutricionais e das condições de crescimento que

podem estimular ou limitar o crescimento das diferentes populações presentes. Existe ainda, a influência da rizosfera das plantas, levando ao desenvolvimento de uma população altamente especializada de microorganismos, sob condições de aeração, pH, disponibilidade de nutrientes e fatores estimulatórios completamente diferentes das áreas do solo fora desta zona de influência.

Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo, cujas populações são altamente influenciadas pela rizosfera das plantas, o rizóbio é considerado o grupo mais significativo na agricultura tropical, pela sua associação com as leguminosas. Nesse contexto, todas as bactérias capazes de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas são coletivamente denominadas de “rizóbio”.

A família Rhizobiaceae foi primeiramente representada apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual era constituído por bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família Leguminosae. A classificação taxonômica inicial era baseada na especificidade hospedeira, assim, dentro do gênero *Rhizobium* foram reconhecidas seis espécies: *Rhizobium leguminosarum* (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*, *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*), *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) e *R. lupini* (*Lupinus*). O grupo de hospedeiras foi o fator mais significativo na definição dessas espécies, embora tenham sido descritas ainda características morfológicas e fisiológicas. Essa classificação, baseada essencialmente na infecção da planta, de acordo com os “grupos de inoculação cruzada”, deixou de ser utilizada em virtude do grande número de exceções dentro desses grupos.

Posteriormente, tomou-se como instrumento para a diferenciação entre os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, as características culturais e morfológicas em Meio 79 de Fred & Waksman (1928) modificado para Meio YMA (VINCENT, 1970). O tempo de crescimento no meio de cultura, por exemplo, constitui-se numa característica importante para a caracterização preliminar das bactérias fixadoras de nitrogênio noduladoras em leguminosas. Inicialmente considerava-se bactérias de crescimento rápido as espécies que demoravam de 2 a 3 dias para apresentar colônias isoladas no meio de cultura, e, acima disto, eram consideradas de crescimento lento. Bactérias de crescimento rápido e lento foram, então, separadas em dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*

respectivamente (JORDAN, 1984)². Atualmente, existem espécies que apresentam crescimento intermediário (4 a 5 dias) e as de crescimento muito lento, que demoram mais de 10 dias para que se consiga observar o aparecimento das colônias.

Durante muito tempo, a classificação taxonômica foi fundamentada pelos métodos tradicionais de caracterização fenotípica, tanto morfológica como fisiológica. As primeiras modificações nesses estudos começaram a ser introduzidas pela utilização de métodos de taxonomia numérica. Para Leitão (1997), esse tipo de abordagem permitiu a análise conjunta das características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, sorológicas e moleculares, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os microorganismos, de uma forma menos subjetiva e mais rigorosa, fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre as bactérias. A aplicabilidade desses estudos fenotípicos possibilitava além de um levantamento preliminar da diversidade presente no solo, o fornecimento de dados sobre a expressão de características fisiológicas que poderiam ser correlacionadas com determinados fatores ambientais.

Conforme Stralio (2005b), a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas sofreu contínuas modificações como reflexo da evolução no campo da sistemática bacteriana. Com o advento dos métodos moleculares de análise filogenética baseados no estudo do genoma bacteriano, tornou-se imprescindível correlacionar as diferenças taxonômicas com as características fenotípicas. A partir disso, para a definição de novas espécies, recomenda-se o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações, fenotípicas, genotípicas e filogenéticas do microorganismo de interesse, buscando uma classificação consensual (STRALIO, 2005a). Assim, qualquer estirpe-padrão pode ser depositada numa coleção de culturas reconhecida e disponibilizada à pesquisa. Stralio (2005b) aponta que para a estirpe-padrão e isolados representativos, as seguintes características devem ser fornecidas: desempenho simbiótico baseado em parâmetros selecionados; características morfológicas, culturais e bioquímicas; grau de homologia DNA:DNA; hibridização RNAr:DNA e análise do 16S RNAr; polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição do DNA (RFLPs) e eletroforese de enzimas multilocus (MLEE).

²JORDAN, D. C., 1984 apud STRALIO, 2005a.

2.6 Espécies de Diazotróficos em Simbiose com o Gênero *Mimosa*

Embora fosse generalizadamente aceito por muitos anos que as leguminosas nodulassem exclusivamente com membros da família Rhizobiaceae na classe α -proteobacteria, vários trabalhos publicados relatam que membros da classe β -proteobacteria foram isolados de nódulos, sobretudo o gênero *Burkholderia*, que inclui patógenos humanos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O gênero *Mimosa* pode nodular com uma variedade de espécies de diazotróficos, dentre os quais, representantes das α -proteobacteria. Conforme Oyaizu et al. (1993), estirpes obtidas de *Mimosa invisa* e *Mimosa pudica*, isoladas nas Filipinas, foram descritas como *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*. Em Wang et al. (1999), cinquenta isolados de nódulos radiculares de *Mimosa affinis*, uma pequena leguminosa nativa do México, foram identificados como *Rhizobium etli*. No entanto observou-se que se tratava de um grupo restrito de linhagens com baixa diversidade genética dentro da espécie, onde os isolados de *Mimosa affinis* diferiam das estirpes de *Rhizobium etli* originadas a partir de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Deste modo, um novo biovar, bv. mimosae, foi proposto dentro de *Rhizobium etli* para abranger os isolados obtidos de *Mimosa affinis*.

Em isolamentos de nódulos radiculares de *Mimosa pudica* e *M. diplotricha* situadas na parte sul de Taiwan, Chen et al. (2001), relataram o isolamento de bactérias da espécie *Ralstonia taiwanensis*, posteriormente renomeada como *Cupriavidus taiwanensis*. Colocam ainda que, *R. taiwanensis* nodulando o gênero *Mimosa*, é a primeira espécie pertencente a β -proteobacteria conhecida por ser capaz de formar nódulos radiculares e fixar nitrogênio efetivamente. Resultado similar foi encontrado por Verma et al. (2004) também pesquisando simbioses bacterianas em *Mimosa pudica*. Em nódulos desta leguminosa cultivada no norte e sul da Índia isolou-se a estirpe *Ralstonia taiwanensis*, atual *Cupriavidus taiwanensis*.

No trabalho de Moulin et al. (2001) é explorada a diversidade filogenética dos fixadores de nitrogênio simbioses em leguminosas tropicais, sendo isoladas bactérias oriundas de nódulos de *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum*. A estirpe STM678, originalmente isolada na África do Sul da leguminosa *A. carnosa*, acreditava-se pertencer ao grupo de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. No entanto, por meio da análise filogenética de seqüências de genes da subunidade de RNA

ribossomal (16S RNAr), foi evidenciado que de fato pertence à classe de β -proteobacteria. A partir desta análise, encontraram-se as sequências mais estreitamente relacionadas à apresentada pela estirpe, sendo elas: *Burkholderia kururiensis* (96,9% de similaridade), *B. brasilense* (96,8% de similaridade) e *B. graminis* (96,8% de similaridade). Em nódulos radiculares coletados de leguminosas na Guiana Francesa, particularmente em *Machaerium lunatum*, identificou-se outra estirpe dentro do gênero *Burkholderia*, a estirpe STM815. O sequenciamento revelou proximidade filogenética com: *Burkholderia kururiensis* (96,9%), *B. brasilense* (96,8%), *B. graminis* (96,6%) e com a estirpe STM678 (96,9%). As análises filogenéticas colocam, inequivocamente, as estirpes STM678 e STM 815 no gênero *Burkholderia* dentro da classe β -proteobacteria. Estes autores sugeriram a utilização dos termos α -rizóbio e β -rizóbio para distinguir as proteobactérias nodulantes de leguminosas.

Vandamme et al. (2002) estudaram a taxonomia de cinco isolados obtidos a partir de nódulos radiculares de leguminosas tropicais: *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha* de Taiwan; *Alysicarpus glumaceus* do Senegal (África Ocidental); *Aspalathus carnosae* da África do Sul e *Machaerium lunatum* da Guiana Francesa. Os resultados mostraram que os cinco isolados representam quatro espécies distintas, *Burkholderia caribensis*, *B. cepacia* genomovar VI, e as novas espécies *B. tuberum* e *B. phymatum*.

Outras estirpes do gênero *Burkholderia* foram isoladas de nódulos radiculares de *Mimosa pigra*, *Mimosa casta*, *Mimosa pudica* e *Abarema macradenia*, na ilha de Barro Colorado, no Panamá. Entre os 51 isolados, 44 pertenciam a estirpes de *Burkholderia*, enquanto os demais foram colocados nos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (BARRETT; PARKER, 2005).

Chen et al. (2005) corroboram, em estudo com bactérias nodulantes em *Mimosa* na América do Sul, que estirpes de *Burkholderia* podem estabelecer de maneira eficaz uma interação simbiótica com as leguminosas. Para isso, isolaram vinte estirpes oriundas de nódulos radiculares de espécies do gênero *Mimosa* situadas no Brasil (*M. acutistipula*, *M. bimucronata*, *M. camporum*, *M. caesalpiniaefolia*, *M. flocculosa*, *M. laticifera*, *M. pigra*, *M. scabrella* e *M. tenuiflora*) e na Venezuela (*M. pigra*). As estirpes foram classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e estavam intimamente relacionadas com outras espécies nodulantes desse gênero, como *B. caribensis*, *B. phymatum* e *B. tuberum*. Os autores comentam que todas as estirpes brasileiras utilizadas

foram originalmente isoladas a mais de 20 anos por de Faria e outros (não publicado) e são testadas por terem a capacidade de nodular eficazmente seus hospedeiros originais e ainda outras *Mimosa* spp. É relatado ainda, que da relação de estirpes brasileiras representativas, a Br3454 é de particular interesse, devido à sua particularidade na capacidade de infectar e nodular *M. scabrella*.

Como comprovado por Faria et al. (1988), diferentemente da maioria das leguminosas onde a infecção está associada à zona de crescimento dos pêlos como a via de penetração comumente utilizada pela bactéria, ou ainda, por meio da penetração intercelular na emergência das raízes laterais, a estirpe Br3454 apresenta comportamento incomum no método de infecção. Especificamente para a hospedeira *Mimosa scabrella* Benth., a infecção é via processo epidérmico, onde a bactéria penetra entre as células epidérmicas, não estando associada às raízes laterais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, Isolamento e Caracterização Morfológica de Diazotróficos

O levantamento da riqueza de bactérias fixadoras de nitrogênio em bracinga (*Mimosa scabrella* Benth.) foi realizado por meio da coleta de nódulos radiculares em 7 áreas de diferentes condições edafoclimáticas, compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-oeste do Estado de Santa Catarina (Figura 1). Todos os pontos de coleta estavam inseridos nos grupos de vegetação do domínio Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa e Campos de Altitude). Evitou-se a coleta de amostras em áreas estagnadas ou em locais muito próximos à rodovia. Amostras de solo também foram coletadas em cada ponto e posteriormente foram analisadas (Tabela 1) no Laboratório de Análises de Solos do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. O procedimento de coleta dos nódulos e do solo foi conduzido de maneira que todos os locais de coleta foram identificados com o nome do município e marcados com o auxílio de aparelho GPS (Garmin Etrex Vista HCx). Os sacos de coleta foram identificados adequadamente com o número do ponto, mantidos resfriados e abertos somente no momento da análise, no Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo do Departamento de Solos e Recursos Naturais da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-Cav). Tais procedimentos garantiram a confiabilidade e a integridade das amostras, no

período de tempo hábil para que o isolamento e a análise fossem executados dentro do prazo limite de preservação.

Uma vez obtidas as amostras, realizou-se o isolamento e obtenção de culturas de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae (BFNNL), conforme metodologia descrita em Vincent (1970). De cada ponto amostral, 6 nódulos ao acaso foram destacados cuidadosamente do sistema radicular. Depois de retirados, os nódulos foram lavados em água destilada e esterilizada para diminuir o risco de contaminação na câmara de fluxo laminar. Posteriormente, os nódulos foram desinfestados superficial e individualmente durante 1 minuto em álcool (95%), 10 minutos em hipoclorito de sódio comercial diluído (2%) e lavados por 5 vezes em água destilada e esterilizada. Em seguida, os nódulos foram macerados com um bastão de vidro esterilizado e, com a alça de platina semeados em meio de cultura contendo Extrato de Levedura, Manitol e Ágar (Meio 79) de Fred & Waksman (1928) modificado para Meio YMA (VINCENT, 1970), com ajuste de 5 g.L⁻¹ de manitol, e ainda, os corantes Vermelho Congo ou Azul de Bromotimol em pH 6,8. As placas foram incubadas sob temperatura de 28°C, no escuro, em câmara B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*), e o crescimento foi acompanhado diariamente. O método de semeadura em placas com meio sólido, realizada com a técnica de riscagem em estrias múltiplas, buscou maximizar o esgotamento de bactérias para uma melhor obtenção de colônias isoladas. Alguns cuidados particulares como flambar a alça de platina após cada série de estrias, seu arrefecimento na extremidade da placa e a inversão das placas antes da incubação, foram tomados para se obter o isolamento de qualidade e evitar a contaminação por gotículas de água que condensam na parte interna da tampa da placa.

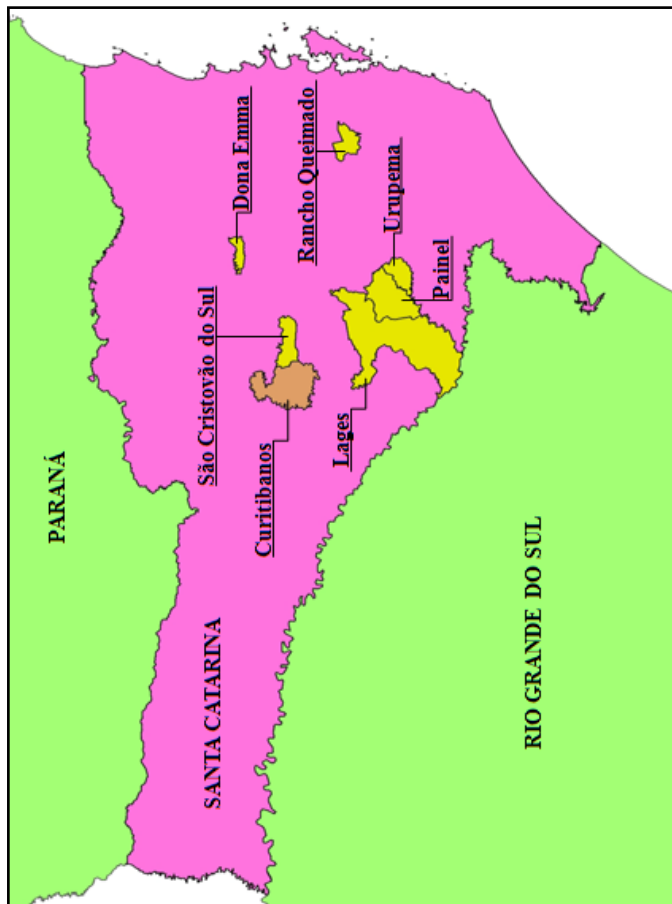
Foram realizados cultivos sucessivos para a obtenção de colônias puras. Após a purificação dos isolados, procedeu-se à caracterização cultural e morfológica conforme Martins et al. (1997) com modificações. A origem e a denominação atribuída para cada diazotrófico isolado estão apresentadas na Tabela 2. A estirpe Br3454 - *Burkholderia mimosarum* (CHEN et al., 2006), cedida pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ - Brasil), foi incluída na análise como referência para comparação das características culturais e morfológicas. As colônias foram avaliadas aos três e aos sete dias quanto aos parâmetros: tempo de crescimento; diâmetro; cor; transparência; forma; borda; elevação; superfície; volume, consistência e aparência do muco. Com a incorporação do indicador de pH azul de bromotimol, a partir do quinto dia de crescimento, observou-se a coloração

do meio de cultura de acordo com a natureza ácida, alcalina ou neutra dos metabólitos produzidos.

Formou-se uma coleção de trabalho na qual as bactérias foram mantidas em meio YMA inclinado, a 4°C. Esta armazenagem objetivou a conservação das bactérias sem que ocorresse contaminação, possibilitando a posterior caracterização genética destes isolados de diazotróficos.

As características culturais e morfológicas dos isolados foram convertidas em uma matriz binária de presença e ausência. Deste modo, agruparam-se os isolados em um Dendrograma de Similaridade, gerado por meio do aplicativo computacional PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis), utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard (HAMMER et al., 2001).

Figura 1 - Localização das áreas¹ de coleta de nódulos radiculares de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) de diferentes condições edafoclimáticas.



Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

¹Em marrom, o município onde se coletou somente o solo para experimento em Casa de Vegetação.

Tabela 1 - Análises de solo das áreas de coleta de nódulos radiculares de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). O item “Solo” refere-se à análise de solo utilizado para experimento em Casa de Vegetação.

Isolado	Município	pH(H ₂ O)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**
A11	Lages	4.2	0.33	0.3	3.65	4	160	6.2
A12								
A31	Lages	4.1	1.75	0.57	2.35	5	195	10.2
A32								
A41	Painel	4.7	3.87	1.6	0.55	5	73	11.3
A42								
A51	Dona Emma	4.3	1.47	0.61	0.95	5	97	9.1
A52								
A61	Rancho Queimado	4.6	2.11	0.76	0.75	9	198	11.5
A62								
A8	Urupema	4.4	3.82	1.51	0.89	3	170	12.4
A91	São Cristovão do Sul	4.2	3.88	0.99	1.2	4	87	5.5
A92								
Solo	Curitiba	6.6	12.79	5.04	0	240	310	1.7
(Casa de Vegetação)								

* Valores em cmolc/dm³

** Valores em mg/dm³

Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

Tabela 2 - Denominação atribuída aos diazotróficos isolados das 7 áreas de coleta compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-oeste do Estado de Santa Catarina.

Isolado	Município	Coordenadas (UTM)	Altitude (m)
A11 A12	Lages	J 0573844 L 6925943 S	974
A31 A32	Lages	J 0574032 L 6923043 S	957
A41 A42	Painel	J 0583532 L 6914676 S	1128
A51 A52	Dona Emma	J 0612441 L 7016195 S	563
A61 A62	Rancho Queimado	J 0693333 L 6935529 S	717
A8	Urupema	J 0613050 L 6909807 S	1539
A91 A92	São Cristovão do Sul	J 0563147 L 6975450 S	1126

Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

3.2 Avaliação da Eficiência Simbiótica na FBN

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-Cav), de fevereiro a agosto de 2012. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 15 tratamentos (13 isolados, a estirpe referência (Br3454) e a testemunha absoluta sem nitrogênio e sem inoculação) e 30 repetições, perfazendo um total de 450 unidades amostrais.

Para o cultivo das plantas foram utilizados tubetes de 290 cm³ contendo solo do tipo Nitossolo não esterilizado e substrato de casca de pinus na proporção de 2:1, sem adubação nitrogenada, procedente do município de Curitiba (SC) (Figura 1). Na instalação do experimento, foram utilizadas 5 sementes de *Mimosa scabrella* Benth. por tubete, oriundas de árvores selecionadas. A desinfecção e a superação de dormência foram realizadas pela imersão da semente em água (SACCO, 1974)³ a 80°C por 5 minutos e posterior embebição por 18 horas em temperatura ambiente (BIANCHETTI, 1981), sendo que a semente foi efetuada imediatamente após, sem pré-germinação.

A partir dos isolados de diazotróficos obtidos, o inóculo foi produzido em frascos de erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido (Extrato de Levedura e Manitol) (Meio 79) de Fred & Waksman (1928) modificado para Meio YMA (VINCENT, 1970), com ajuste de 5 g.L⁻¹ de manitol, acondicionado na Incubadora Orbital (Shaker) MA 420 por 120 horas a 28°C e 60 rpm. A concentração de bactérias utilizada foi entre 10⁷ e 10⁸ UFC.mL⁻¹ na fase de crescimento exponencial, determinada pelo método de contagem microscópica direta por câmara de Neubauer.

Durante a instalação do experimento, aplicou-se 1mL/tubete do inoculante bacteriano em dois momentos, na semente e após 20 dias. A reaplicação do inoculante foi realizada para garantir a existência de bactérias viáveis para nodulação, uma vez que foi constatada a prática de pulverização com agrotóxicos dentro da casa de vegetação. Concomitante à reaplicação do inoculante, procedeu-se à semente das unidades amostrais em que as plântulas não se estabeleceram. É oportuno destacar que, antes das aplicações do inoculante, utilizou-se 1mL/tubete de exsudato de *Mimosa scabrella* Benth. resultante da imersão e embebição das sementes para superação da dormência, conforme o trabalho de Mercante et al.

³SACCO, J.C., 1974 apud BIANCHETTI, A., 1981.

(2002). O desbaste foi efetuado 30 dias após a emergência (DAE) e apenas a planta que apresentou melhor viabilidade na emergência foi mantida.

Aos 40 dias após a emergência, foi verificada a presença de larvas de tripes causando danos às plantas. Como medida de controle, as plantas foram pulverizadas com Decis[®] 25 EC (Registro MAPA nº 00758498), um inseticida de contato e ingestão do grupo dos piretróides, durante os meses de abril e maio divididos em 6 aplicações. Após cada aplicação, optou-se pelo fornecimento da solução nutritiva de Somasegaran & Hoben (1985), modificada conforme Hungria (1994), para recuperação e desenvolvimento das plantas.

As coletas de material vegetal foram realizadas aos 120, 135, 150 e 157 dias após a emergência, distribuídas nos meses de junho, julho e agosto de 2012, sendo coletadas três amostras por tratamento. A parte aérea das plantas foi acondicionada em sacos de papel, armazenadas em estufa de circulação forçada a 65°C, durante 72 h, para se proceder à avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA). Os nódulos foram secos nas mesmas condições, contados e avaliados quanto à massa, e as raízes, após coleta dos nódulos e limpeza de todos os resquícios de substrato, foram secas também em estufa a 65°C. Após a mensuração, a massa seca da parte aérea (MSPA) foi moída e submetida à digestão ácida, destilação e titulação, para a determinação de N acumulado na parte aérea conforme o Método Kjeldahl descrito em Tedesco et al. (1995). Foram adicionados 200 mg de cada amostra em tubos de ensaio de 20 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Adicionou-se em cada amostra 1 mL de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 30%, 2 mL de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e 0,7 g do catalisador Sulfato de Cobre (CuSO₄). Os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura inicial entre 160-180°C. No intervalo de aproximadamente 120 minutos, a temperatura foi elevada gradativamente até 360°C, sendo mantidos até adquirirem a cor verde claro. Após a digestão, os tubos ficaram acondicionados em estante de ferro dentro da capela para resfriamento. As amostras foram diluídas em balões de 50 mL com água destilada e transferidas para frascos “snap-cap” de 90 mL. O sal formado, borato de amônio, após processo de destilação, foi titulado com Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 0,025M, até ponto de viragem do indicador de ácido bórico, que é a passagem da coloração verde da amostra para a coloração rosa claro.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo Teste de Tukey, utilizando-se o software WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003), versão 1.0. Para os testes efetuados entre os

tratamentos e entre as épocas, considerou-se o nível mínimo de significância de 5%.

3.3 Caracterização Genética dos Isolados de Diazotróficos

A caracterização genética dos isolados obtidos foi realizada na Universidade Federal de Santa Maria. Os diazotróficos foram incubados em frascos contendo o meio líquido (Extrato de Levedura e Manitol) (Meio 79) de Fred & Waksman (1928) modificado para Meio YMA (VINCENT, 1970), por 72 horas a 28°C e 120 rpm.

As etapas para o sequenciamento do gene 16S rDNA iniciaram com a extração do DNA dos isolados a partir da utilização do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ conforme as instruções e protocolo fornecidos pelo fabricante (Zymo Research Corporation). Em seguida, procedeu-se à amplificação da região codificadora por técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), empregando-se os conjuntos: 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTAC GACTT3') (LANE, 1991)⁴.

As condições de amplificação consistiram em: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento a 55°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos; e extensão final a 72°C por 7 minutos. Após, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C. Foi utilizada a alíquota de 1 µL do DNA extraído, totalizando o volume final de 25 µL por reação. A concentração final dos reagentes foi de 2,5 µL de tampão de PCR, 10x, 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 25 picomoles. As reações foram realizadas em um termociclador (Analítica TC-312) e os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba horizontal com tampão TBE 1x. As amostras foram coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia) em um transiluminador de luz ultravioleta e documentadas com equipamento de fotografia digital.

Para a realização do sequenciamento completo do gene ribossomal 16S, o produto da reação de PCR foi purificado com as instruções e protocolo do kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich).

Posteriormente à reação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento na ACTGene Análises Moleculares Ltda no município de Alvorada (RS).

⁴LANE, 1991 apud MARRA et al., 2012.

3.4 Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos

A classificação taxonômica dos isolados obtidos iniciou com a leitura e análise dos fragmentos sequenciados utilizando-se o aplicativo computacional Staden Package (STADEN et al., 2003). A partir disso, a sequência consensual resultante foi inserida no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)⁵ na plataforma de recursos populares BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O banco de dados possibilita encontrar regiões de similaridade local entre sequências, comparando nucleotídeos ou proteínas e calcula a significância estatística dos resultados. Deste modo, são fornecidas possibilidades de identificação dos diazotróficos nodulantes nativos, a partir de microorganismos já descritos e inseridos neste banco de dados.

Para a confirmação da identificação dos gêneros foi considerada uma similaridade de sequência de bases igual ou superior a 97%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Cultural e Morfológica dos Diazotróficos

A partir do isolamento de diazotróficos nodulantes em *Mimosa scabrella* Benth. nativos de diferentes ambientes edafoclimáticos, foram obtidos 12 isolados (Tabela 3).

Para todos os isolados o tempo de crescimento foi considerado rápido (até 3 dias). Com relação a algumas características coloniais, todos os isolados apresentaram colônia com diâmetro maior que 1,0 mm, formato circular e borda lisa. Quanto à coloração da colônia, foram obtidos isolados de coloração branca leitosa (92%) e amarela (8%). Para os parâmetros elevação e transparência da colônia, os isolados apresentaram distribuição de 69% para elevação convexa e 31% para elevação achatada, e ainda 54% são colônias opacas e 46% são colônias translúcidas.

Dentre os isolados que apresentaram superfície da colônia mucóide, 50% foram avaliados como possuindo um volume intermediário de muco, os outros 50% ficaram divididos em colônias com pouco e com muito muco. O volume de muco abundante não teve representantes. Quanto

⁵ Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. (Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 07/08/2013.

à consistência e aparência do muco, 38% dos isolados apresentaram consistência e aparência viscosa, 13% com consistência viscosa e aparência floculosa, 38% com consistência viscosa e aparência aquosa, 13% com consistência viscosa e aparência gomosa. Não foram obtidos representantes com muco de consistência e aparência butírica.

Com a incorporação do indicador de pH azul de bromotimol, a partir do quinto dia de crescimento, observou-se a coloração do meio de cultura de acordo com a natureza ácida, alcalina ou neutra dos metabólitos produzidos. A maioria dos isolados acidificou o meio (54%), 23% alcalinizou e os outros 23% não alteraram o pH do meio.

Foi observada uma ampla diversidade cultural e morfológica (Figura 2) entre os diazotróficos presentes nos nódulos de bracatinga, havendo um predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, de formato circular, borda lisa e superfície mucóide. Dentre os parâmetros avaliados, infere-se que a transparência da colônia, a produção de muco e a alteração do pH foram considerados relevantes para a diferenciação dos isolados.

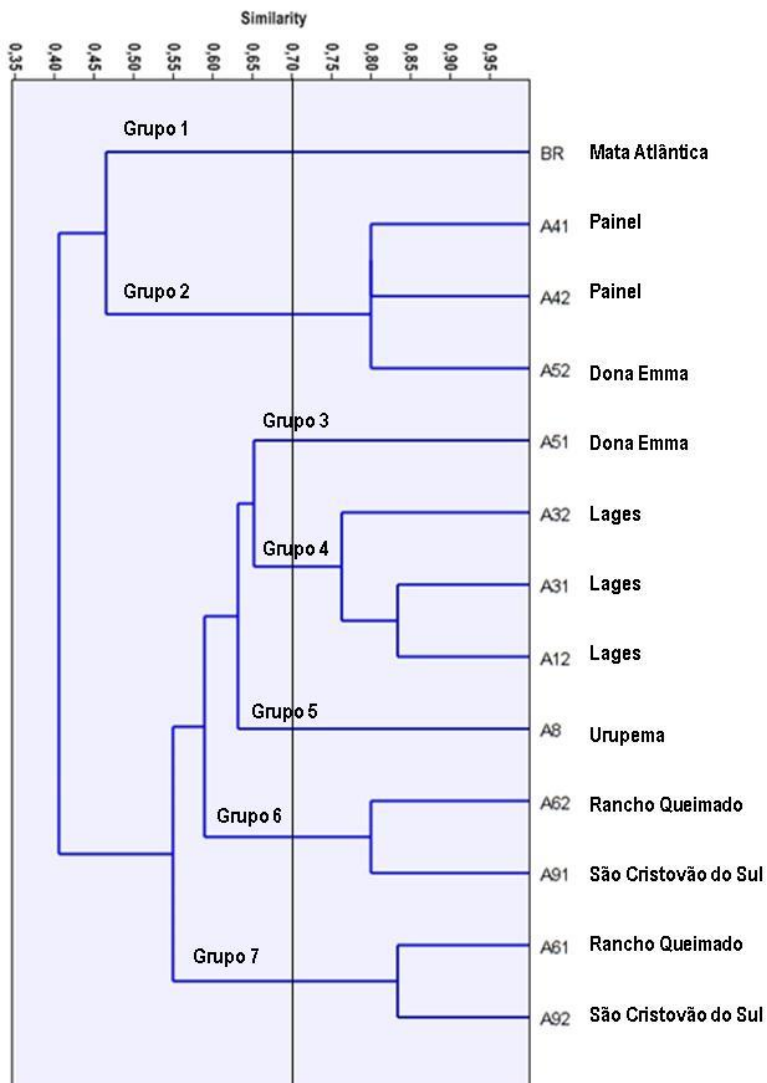
Tabela 3 - Características culturais e morfológicas dos diazotróficos nodulantes em *Mimosa scabrella* Benth. nativos de diferentes ambientes edafoclimáticos.

Isolado	Município	TC ¹	pH ²	DC ³	CC ⁴	TC ⁵	FC ⁶	BC ⁷	EC ⁸	SC ⁹	VM ¹⁰	CAM ¹¹
A11	Lages	R	Al	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	V
A12		R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	V
A31	Lages	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	V
A32		R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	F
A41	Prámel	R	Al	Ma	B	T	C	Li	A	S	-	-
A42		R	Ac	Ma	B	T	C	Li	A	S	-	-
A51	Dona Emma	R	N	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	P	V
A52		R	N	Ma	B	T	C	Li	A	S	-	-
A61	Rancho Queimado	R	Ac	Ma	B	T	C	Li	Conv	M	Mui	A
A62		R	N	Ma	B	O	C	Li	Conv	S	-	-
A8	Urupema	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Mui	G
A91	São Cristóvão do Sul	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	S	-	-
A92		R	Ac	Ma	B	T	C	Li	Conv	M	Me	A
BR	-	R	Al	Ma	A	T	C	Li	A	M	P	A

Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

¹Tempo de Crescimento (R:rápida; I:intermediária; L:lenta; MT:muito lenta); ²Alteração do pH do Meio (Ac:acidificam; Al:alcalinizam; N:não alteram); ³Diâmetro da Colônia (Ma:maior 1,0mm; Me:menor 1,0mm); ⁴Cor da Colônia (B:branca; A:amarela; R:rósea; V:vermelha); ⁵Transparência da Colônia (O:opaca; T:translúcida); ⁶Forma da Colônia (P:puntiforme; C:circular; I:irregular); ⁷Borda da Colônia (Li:lisa; Lo:lobada); ⁸Elevação da Colônia (Conv:convexa; Con:cônica; A:achatada); ⁹Superfície da Colônia (S:seca; M:mucóide); ¹⁰Volume de Muco (P:pouco; Me:médio; Mui:muito; A:abundante); ¹¹Consistência e Aparência do Muco (V:viscosa; F:floculosa; A:aquosa; G:gomosa; B:butírica).

Figura 2 - Dendrograma de Similaridade entre os diazotróficos, gerado pelo aplicativo computacional PAST (HAMMER et al., 2001) utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard. Formação de grupos com base em parâmetros culturais ao nível de 70% de similaridade.



Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

4.2 Avaliação da Eficiência Simbiótica na FBN

Para a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e nitrogênio acumulado (N acum.), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4), sugerindo que tanto os isolados nativos do solo e a estirpe referência, Br3454, não exerceram influência sobre o crescimento foliar e radicular da bracinga.

Quanto à massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN), foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 4), evidenciando que os isolados estudados diferem com relação à capacidade de nodular a bracinga.

As maiores médias para MSN e NN foram observadas nos isolados A8, A91, A92 e A52. Em TA (testemunha sem inoculação) e BR (estirpe referência Br3454), não foram encontrados nódulos, indicando que não houve infecção pelos isolados nativos do solo e sucesso na nodulação, respectivamente. Este trabalho foi realizado a partir de um solo oriundo de área com vegetação nativa, Floresta Ombrófila Mista, sem registro do uso de inoculantes biológicos, o que pode ter sido um fator limitante e dificultador na nodulação das estirpes testadas.

Embora a massa seca de nódulos (MSN) e o número de nódulos (NN) sejam parâmetros sugestivos para a avaliação da eficiência simbiótica revelando o desempenho de nodulação de cada isolado, ao considerar os resultados obtidos, observou-se que mesmo com a efetivação da simbiose nem sempre existe a garantia de um incremento no processo de fixação biológica de nitrogênio. Isso é corroborado pelos isolados nativos no processo de estabelecimento da simbiose. Embora tenham apresentado maior número de nódulos (NN), sugerindo serem estirpes mais competitivas que a estirpe referência, foram obtidos valores de MSPA, MSR e N acum. semelhante desta (Tabela 4), comprometendo assim, a eficiência simbiótica. Desta forma, considera-se que apesar da alta nodulação do isolado A8, diferenças significativas na produção de MSPA não foram observadas. Os nódulos, embora abundantes, eram pequenos e esbranquiçados, sugerindo baixa atividade de fixação de N, o que poderia explicar a baixa eficiência em incrementar a produção de MSPA.

Conforme já visto, a associação bactéria-leguminosa reflete parâmetros evolutivos entre os seres vivos que estabelecem esta relação ecológica, seja pelo reconhecimento de sinais moleculares ou pela especificidade simbiótica. Além das diferentes condições ambientais de origem de cada estirpe, as interações entre as estirpes testadas com os

microorganismos do solo, incluindo os diazotróficos nativos, implicaram na sobrevivência, no estabelecimento e nas propriedades simbióticas de algumas das estirpes utilizadas no experimento. O genótipo de bracinga selecionado não apresentou nodulação natural a partir dos diazotróficos autóctones oriundos do solo utilizado. Isso pode ser indicativo de uma baixa capacidade nodulífera ou possível incompatibilidade deste genótipo com as populações nativas ali presentes. Isto é corroborado pela ausência de nodulação na testemunha pelos diazotróficos nativos do solo, uma vez que, esta não recebeu inoculante com as estirpes testadas.

A avaliação dos isolados entre as quatro épocas de coleta, possibilitou separá-los de acordo com a capacidade de incrementar a MSPA, MSR e o N acumulado (Tabela 5). A época de coleta (E2) efetuada aos 135 dias após o plantio, apresentou diferença significativa de acréscimo para os três parâmetros citados. Já a época de coleta (E3) efetuada aos 150 dias após o plantio, teve resultado significativo apenas para MSPA e MSR. Para a MSPA os isolados A12, A41, A51, A52, Br3454, A42 e A62 tiveram desempenho expressivo quando comparados aos demais. Com relação à MSR, mostraram-se significativos os valores observados nos isolados A41, A52, A8 e A42. Quanto ao N acumulado, os isolados A52 e Br3454 obtiveram as maiores médias. É importante destacar a particularidade do isolado A52, o único a apresentar incremento de MSPA, MSR e N acumulado.

Tabela 4 - Massa seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e de nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e nitrogênio acumulado na MSPA (N acum.) entre os tratamentos¹.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MSN (g)	Nº Nódulos	N acum. (mg/planta)
A11	6,600 a	3,782 a	0 b	0 b	51,000 a
A12	7,252 a	4,289 a	0,718 ab	1,250 b	57,000 a
A31	6,194 a	3,637 a	0,262 b	0,333 b	53,000 a
A32	7,000 a	4,023 a	0,460 ab	0,750 b	61,000 a
A41	7,682 a	3,790 a	0 b	0 b	58,000 a
A42	7,352 a	3,877 a	0,232 b	0,583 b	53,000 a
A51	6,550 a	3,799 a	0,239 b	0,417 b	51,000 a
A52	6,207 a	4,297 a	0,437 ab	2,000 ab	50,000 a
A61	5,668 a	4,017 a	0 b	0 b	43,000 a
A62	6,401 a	3,097 a	0,333 ab	0,583 b	61,000 a
A8	7,291 a	4,104 a	1,557 a	6,583 a	65,000 a
A91	7,126 a	4,093 a	1,150 ab	3,583 ab	56,000 a
A92	5,592 a	4,124 a	0,695 ab	2,083 ab	46,000 a
BR	7,259 a	3,948 a	0 b	0 b	54,000 a
TA	6,769 a	3,517 a	0 b	0 b	60,000 a
CV (%)	34,700	45,854	223,804	278,166	38,780

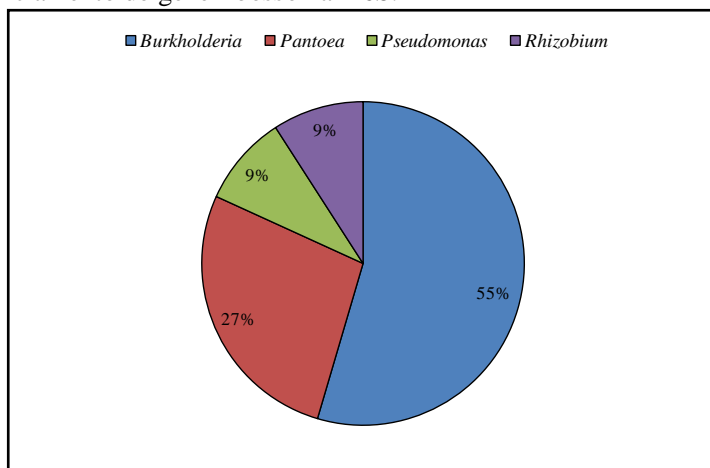
Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹Para código dos tratamentos, ver tabela 3. TA - controle sem inoculação.

4.3 Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos

A partir dos conjuntos de bases obtidos pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S e comparação no banco de dados do NCBI, os isolados de diazotróficos obtidos foram distribuídos em quatro gêneros de α , β e γ -proteobacteria. Por meio da classificação taxonômica dos isolados de diazotróficos de bracatinga, constatou-se que as sequências de α -proteobacteria pertencem ao gênero *Rhizobium*, as sequências de β -proteobacteria alinham-se com o gênero *Burkholderia* e as sequências de γ -proteobacteria foram similares aos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas* (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição dos isolados de diazotróficos de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) entre os gêneros, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.



Fonte: Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo, 2013.

4.3.1 Classe β -proteobacteria (Gênero *Burkholderia*)

O gênero *Burkholderia* foi criado por Yabuuchi et al. (1992), para adequar o antigo grupo rRNA II de *Pseudomonas* (*P. solanacearum*, *P. pickettii*, *P. cepacia*, *P. gladiolos*, *P. mallei*, *P. caryophylli*) e que, posteriormente, foram excluídas as espécies *P. pickettii* e *P. solanacearum*,

pois foram transferidas para o gênero *Ralstonia*. Membros do gênero *Burkholderia* são organismos versáteis que ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos. O estudo destas bactérias tem aplicabilidade na área da biorremediação, na fixação biológica de nitrogênio, na promoção do crescimento vegetal, e ainda as espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, como causadoras de infecções em seres humanos, sobretudo em pacientes com fibrose cística.

Tanto no ecossistema natural quanto em ecossistemas manejados, este gênero de bactérias habita comumente a rizosfera ou tecidos internos das plantas. Compant et al. (2008) considera que o grupo de bactérias com maior diversidade e adaptabilidade ambiental que realizam simbiose com plantas pertence ao gênero *Burkholderia*. De acordo com Coenye e Vandamme (2003), em simbiose com os vegetais, várias estirpes são conhecidas por aumentar a resistência à doenças, possibilitar a fixação de nitrogênio e, em geral permitir maior adaptação a estresses ambientais. Assim, o desenvolvimento de trabalhos que confirmem estas premissas, tem estimulado um interesse crescente no isolamento e experimentação do gênero *Burkholderia* na agricultura.

Na classificação taxonômica dos isolados de diazotróficos de bracinga, houve predomínio de β -proteobacteria (55%) com ocorrência de indivíduos do gênero *Burkholderia*. Conforme mencionado em Coenye e Vandamme (2003), esta maioria pode ser explicada pela capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, o que garante ampla distribuição geográfica e ambiental deste gênero, quando comparado a isolados pertencentes às classes de α e γ -proteobacteria.

4.3.1.1 Br 3454 - Estirpe Referência (Embrapa Agrobiologia)

1. *Burkholderia mimosarum*

No trabalho de Chen et al. (2006), foram obtidos 14 isolados oriundos de nódulos radiculares de plantas da espécie *Mimosa pigra* situadas em Taiwan e na Venezuela e ainda da espécie *Mimosa scabrella* nativa do Brasil. Com base na sequência do gene 16S rRNA, todos os isolados demonstraram-se intimamente relacionados entre si e foram classificados como representantes de uma nova espécie, para os quais se denominou *Burkholderia mimosarum* sp. nov.

[mi.mo.sa'rum. N.L. gen. pl. n. *mimosarum* de mimosas (de *Mimosa* spp.), a partir do qual todas as estirpes, incluindo a estirpe tipo, foram isoladas].

As células são Gram-negativas, não-formadoras de esporos e em forma de bastonetes. Após 24h de crescimento em extrato de levedura-manitol e ágar a 28°C, o tamanho médio da célula é de cerca de 0,5-0,7µm (largura) e 0,8-2,0µm (comprimento). O crescimento é observado aos 28, 30 e 37°C. São catalase e oxidase positivas. Assimilam glicose, arabinose, manitol, N-acetilglucosamina e malato. Não produzem indol. Não hidrolisam gelatina e esculina. Não fermentam glicose. Não assimilam maltose, caprato, adipato ou citrato. As estirpes foram isoladas a partir de nódulos radiculares de *Mimosa pigra* e *Mimosa scabrella* (CHEN et al., 2006).

4.3.1.2 Isolado A31 - Lages

1. *Burkholderia* sp.
2. *Burkholderia phymatum*: isolada de nódulos radiculares de leguminosas tropicais (*Machaerium lunatum*) (Guiana Francesa) (VANDAMME et al., 2002).
3. *Burkholderia oxyphila*: isolada de solo ácido de floresta (Japão) (OTSUKA et al., 2011)
4. *Burkholderia tropica*: isolada do abacaxi (Brasil); cana-de-açúcar e milho (Brasil, México e África do Sul) (REIS et al., 2004).
5. *Burkholderia unamae*: isolada do café, cana-de-açúcar e milho (México) (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).
6. *Burkholderia bannensis*: isolada de raiz e caule aéreo de gramínea aquática (*Panicum repens*) (Tailândia) (AIZAWA et al., 2011).

4.3.1.3 Isolado A32 - Lages

1. *Burkholderia* sp.
2. *Burkholderia tuberum*: isolada de nódulos radiculares de leguminosas tropicais (*Aspalathus carnosus*) (África do Sul) (VANDAMME et al., 2002).
3. *Burkholderia mimosarum*: isolada de nódulos radiculares de *Mimosa scabrella* (Brasil) (CHEN et al., 2006).
4. *Burkholderia unamae*: isolada do café, cana-de-açúcar e milho (México) (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).
5. *Burkholderia bryophila*: isolada de *Sphagnum rubellum* (Alemanha); pastagem permanente (Holanda); solo agrícola (Reino Unido) (VANDAMME et al., 2007).
6. *Burkholderia bannensis*: isolada de raiz e caule aéreo de gramínea aquática (*Panicum repens*) (Tailândia) (AIZAWA et al., 2011).

7. *Burkholderia tropica*: isolada do abacaxi (Brasil); cana-de-açúcar e milho (Brasil, México e África do Sul) (REIS et al., 2004).
8. *Burkholderia oxyphila*: isolada de solo ácido de floresta (Japão) (OTSUKA et al., 2011).

4.3.1.4 Isolado A8 - Urupema

1. *Burkholderia* sp.
2. *Burkholderia nodosa*: isolada de nódulos radiculares de *Mimosa bimucronata* e *Mimosa scabrella* (Brasil) (CHEN et al., 2007).
3. *Burkholderia mimosarum*: isolada de nódulos radiculares de *Mimosa scabrella* (Brasil) (CHEN et al., 2006).
4. *Burkholderia bannensis*: isolada de raiz e caule aéreo de gramínea aquática (*Panicum repens*) (Tailândia) (AIZAWA et al., 2011).
5. *Burkholderia tropica*: isolada do abacaxi (Brasil); cana-de-açúcar e milho (Brasil, México e África do Sul) (REIS et al., 2004).
6. *Burkholderia unamae*: isolada do café, cana-de-açúcar e milho (México) (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).
7. *Burkholderia ferrariae*: isolada de material de mina (Brasil) (VALVERDE et al., 2006).

4.3.1.5 Isolado A91 - São Cristovão do Sul

1. *Burkholderia* sp.
2. *Burkholderia caledonica*: isolada do solo (rizosfera) com videira (Escócia) (COENYE et al., 2001).
3. *Burkholderia xenovorans*: isolada de solo contaminado com policlorinato bifenil (EUA); sangue (Suécia); café (México) (GORIS et al., 2004).
4. *Burkholderia phytofirmans*: isolada de raízes de cebola (Canadá); rizosfera de milho, gramíneas e solo (Holanda) (SESSITSCH et al., 2005).
5. *Burkholderia sediminicola*: isolada de sedimentos de água doce (Lago Hakha - Coréia do Sul) (LIM et al., 2008).

4.3.1.6 Isolado A92 - São Cristovão do Sul

1. *Burkholderia* sp.
2. *Burkholderia phymatum*: isolada de nódulos radiculares de leguminosas tropicais (*Machaerium lunatum*) (Guiana Francesa) (VANDAMME et al., 2002).

3. *Burkholderia tuberum*: isolada de nódulos radiculares de leguminosas tropicais (*Aspalathus carnosa*) (África do Sul) (VANDAMME et al., 2002).
4. *Burkholderia bryophila*: isolada de *Sphagnum rubellum* (Alemanha); pastagem permanente (Holanda); solo agrícola (Reino Unido) (VANDAMME et al., 2007).
5. *Burkholderia terrae*: isolada de solos de florestas (Coréia do Sul) (YANG et al., 2006).
6. *Burkholderia unamae*: isolada do café, cana-de-açúcar e milho (México) (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).
7. *Burkholderia bannensis*: isolada de raiz e caule aéreo de gramínea aquática (*Panicum repens*) (Tailândia) (AIZAWA et al., 2011).
8. *Burkholderia tropica*: isolada do abacaxi (Brasil); cana-de-açúcar e milho (Brasil, México e África do Sul) (REIS et al., 2004).

4.3.2 Classe γ -proteobacteria (Gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas*)

O trabalho de Benhizia et al. (2004) foi precursor no relato de que estirpes pertencentes à classe γ -proteobacteria poderiam ocupar nódulos. Nesse estudo, foram identificadas estirpes pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Escherichia* e *Pseudomonas* a partir de nódulos radiculares de três espécies da leguminosa nativa *Hedysarum* em diferentes condições edafoclimáticas na Argélia.

Posteriormente, no trabalho de Muresu et al. (2008) isolaram-se nódulos de espécies selvagens oriundos da Sardenha e Argélia. A partir da análise do gene 16S rRNA por PCR diretamente dos nódulos, constatou-se que a maioria destes continham diazotróficos simbiotes como população predominante, entretanto, foi registrada a presença de outras estirpes não nodulíferas pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Ralstonia* e *Thiobacillus*.

No estudo de Ibáñez et al. (2009), foram isolados os gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, todos pertencentes à classe γ -proteobacteria, a partir de nódulos de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Os isolados ao serem reinoculados não foram capazes de formar nódulos, contudo, quando coinoculados com *Bradyrhizobium* sp.

(SEMIA 6144), considerada uma estirpe eficiente, foram detectados colonizando internamente os nódulos. A partir disso, evidenciou-se que estas estirpes pertencentes à classe γ -proteobacteria são consideradas oportunistas.

O grupo de enterobactérias do gênero *Pantoea* compreende membros isolados a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo superfície de plantas, sementes, solo, água, animais, sangue e urina humana (BERGEY; HOLT, 1994). Na maioria das vezes, são encontrados associados com uma ampla gama de hospedeiros vegetais, como não patogênicos endófitos ou epífitos, colonizando folhas, caules e raízes (DELÉTOILE et al., 2009). Neste contexto, algumas estirpes de *Pantoea* podem ser benéficas para a planta hospedeira, contribuindo para a promoção do crescimento através de processos como a produção de hormônio do crescimento, solubilização do fosfato ou fixação de nitrogênio e ainda fornecendo proteção contra várias bacterioses, doenças fúngicas e podridões pós-colheita. No entanto, estirpes de *Pantoea* também tem sido relatadas como agentes patogênicos oportunistas em seres humanos, principalmente devido à exposição a materiais hospitalares contaminados e patógenos secundários complicando doenças pré-existentes. Os vários nichos ecológicos ocupados por espécies de *Pantoea* são indicativos de uma extensa diversificação dentro do gênero (MAAYER et al., 2012).

A capacidade de membros do gênero *Pseudomonas* em nodular leguminosas foi descrita no trabalho de Shiraishi et al. (2010). Neste estudo, raízes de *Robinia pseudoacacia* (falsa-acácia) foram coletadas de uma floresta costeira e de uma Estação Experimental da Universidade de Tóquio, no Japão. Os testes de inoculação e estudos histológicos revelaram que *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. formaram nódulos e ainda desenvolveram estruturas diferenciadas de nódulos.

Na classificação taxonômica dos isolados de diazotróficos de bracinga a classe γ -proteobacteria foi representada pelo gênero *Pantoea* com 27% e o gênero *Pseudomonas* com 9% dos isolados obtidos.

4.3.2.1 Isolado A12 - Lages

1. *Pantoea* sp.
2. *Pantoea agglomerans*: isolada de sangue (Zimbábue); cereais (Canadá); cebola (África do Sul); *Wisteria floribunda* (Japão) (DELÉTOILE et al., 2009).
3. *Pantoea ananatis*: isolada de abacaxi (Brasil); eucalipto e cebola (África do Sul) (BRADY et al., 2009).

4. *Pantoea eucalypti*: isolada de eucalipto (Uruguai) (BRADY et al., 2009).
5. *Pantoea vagans*: isolada de eucalipto (Uganda, Uruguai e Argentina); milho (África do Sul) (BRADY et al., 2009).
6. *Pantoea anthophila*: isolada de *Impatiens balsamina* (Índia); *Tagetes erecta* (origem desconhecida) (BRADY et al., 2009).
7. *Pantoea dispersa*: isolada de solo (Japão); sorgo (Índia); rosa selvagem (Holanda) (BRADY et al., 2009).
8. *Pantoea brenneri*: isolada de expectoração humana (EUA); uretra humana (EUA) (BRADY et al., 2010).

4.3.2.2 Isolado A61 - Rancho Queimado

1. *Pantoea* sp.
2. *Pantoea agglomerans*: isolada de sangue (Zimbábue); cereais (Canadá); cebola (África do Sul); *Wisteria floribunda* (Japão) (DELÉTOILE et al., 2009).
3. *Pantoea vagans*: isolada de eucalipto (Uganda, Uruguai e Argentina); milho (África do Sul) (BRADY et al., 2009).

4.3.2.3 Isolado A62 - Rancho Queimado

1. *Pantoea* sp.
2. *Pantoea agglomerans*: isolada de sangue (Zimbábue); cereais (Canadá); cebola (África do Sul); *Wisteria floribunda* (Japão) (DELÉTOILE et al., 2009).
3. *Pantoea ananatis*: isolada de abacaxi (Brasil); eucalipto e cebola (África do Sul) (BRADY et al., 2009).
4. *Pantoea eucalypti*: isolada de eucalipto (Uruguai) (BRADY et al., 2009).
5. *Pantoea vagans*: isolada de eucalipto (Uganda, Uruguai e Argentina); milho (África do Sul) (BRADY et al., 2009).
6. *Pantoea anthophila*: isolada de *Impatiens balsamina* (Índia); *Tagetes erecta* (origem desconhecida) (BRADY et al., 2009).

4.3.2.4 Isolado A52 - Dona Emma

1. *Pseudomonas* sp.
2. *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.3 Classe α -proteobacteria (Gênero *Rhizobium*)

Os organismos do gênero *Rhizobium* são caracteristicamente capazes de invadir os pêlos radiculares de leguminosas tropicais, tornando-se simbiontes intracelulares. As estirpes apresentam afinidade com uma variedade de hospedeiros, todavia, algumas possuem certa especificidade ao hospedeiro. As bactérias estão presentes em nódulos radiculares como formas pleomórficas, denominadas de bacterioides, que normalmente estão envolvidos na conversão de nitrogênio atmosférico para uma forma utilizável pela planta hospedeira (BERGEY; HOLT, 1994).

Conforme Martínez-Romero et al. (1991), a partir dos primeiros trabalhos que consideravam os membros do gênero *Rhizobium* nodulantes nas raízes de leguminosas, os diazotróficos que infectavam ervilhas, trevos, e o feijão comum eram agrupados em uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum*, com três biovars (*Rhizobium leguminosarum* biovar viciae; *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii e *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli).

À medida que foram surgindo trabalhos relatando o isolamento de espécies de *Rhizobium* em simbiose com outros gêneros de leguminosas, a classificação deste grupo foi se modificando. Embora já tenha sido mencionado anteriormente, os estudos de Oyaizu et al. (1993), Wang et al. (1999) e Barrett & Parker (2005) descrevem espécies de *Rhizobium* nodulantes no gênero *Mimosa*.

Para analisar a diversidade e as relações de bactérias nas zonas tropicais e subtropicais da China, foram caracterizadas 67 estirpes de bactérias isoladas de nódulos radiculares de cinco espécies de leguminosas dos gêneros *Trifolium*, *Crotalaria* e *Mimosa*. Por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA os isolados foram agrupados em 17 linhagens pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Burkholderia*. O grupo *Rhizobium* apresentou 20 isolados de *Mimosa pudica*, dos quais 15 pertenciam à espécie *Rhizobium leguminosarum*.

Inserido na classe α -proteobacteria, o gênero *Rhizobium* representou 9% dos isolados obtidos.

4.3.3.1 Isolado A42 - Painel

1. *Rhizobium* sp.

2. *Rhizobium lusitanum*: isolado de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* (Portugal); *Macropodium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* (VALVERDE et al., 2006).
3. *Rhizobium tropici*
4. *Rhizobium leucaenae*: isolado de nódulos radiculares de *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *Gliricidia sepium* e *Phaseolus vulgaris*.

5 CONCLUSÃO

Embora a caracterização cultural e morfológica seja uma técnica importante para a identificação e agrupamento dos isolados, é evidente que deve ser complementada com o auxílio de técnicas moleculares para a classificação taxonômica nos diazotróficos.

Por meio desta análise, observou-se uma ampla diversidade cultural e morfológica entre os diazotróficos presentes nos nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), havendo um predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, de formato circular, borda lisa e superfície mucóide. Dentre os parâmetros avaliados, a transparência da colônia, a produção de muco e a alteração do pH foram considerados relevantes para a diferenciação dos isolados.

Por meio do experimento em condições controladas em casa de vegetação, observou-se que mesmo com um substrato limitado em nutrientes, ao longo das quatro épocas de coleta, estabeleceram-se condições favoráveis de incremento de MSPA, MSR e N acumulado para alguns isolados.

Analisando o desempenho da estirpe referência, Br3454, na produção de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca de nódulos (MSN), em relação aos isolados avaliados, pode-se inferir a existência de estirpes nativas tão ou mais adaptadas e competitivas do que a referência, portanto, com potencial para aproveitamento em estudos futuros.

Os isolados A8, A91, A92 e A52 apresentaram melhor capacidade e desempenho de nodulação, comparados aos demais isolados e à estirpe referência, Br3454. Contudo, estudos futuros devem ser conduzidos para avaliação da capacidade de nodulação e eficiência na fixação biológica de nitrogênio destes isolados em um período de tempo maior e em condições de campo.

As bactérias mais frequentes em nódulos da leguminosa *Mimosa scabrella* (Benth.) oriundos de diferentes condições edafoclimáticas foram *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Destes gêneros, algumas espécies são sabidamente diazotróficas e outras podem ser endofíticas de nódulos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, Tomoko; VIJARNSORN, Pisoot; NAKAJIMA, Mutsuyasu; SUNAIRI, Michio. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.61, p.1645-1650, 2011.

ARAZETTI, Viviane Maria; SCCOTI, Marta Silvana Voltapo. Quebra de dormência e tipos de substrato para avaliação da qualidade fisiológica de um lote de sementes de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v.1, n.1, p.69-76, jul. 2010.

AUER, Celso G.; SILVA, Romildo da. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; TSAI, Siu M.; NEVES, Maria Cristina P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.157-172.

BALA, A.; MURPHY, P.J.; OSUNDE, A.O.; GILLER, K.E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.22, p.211-223, 2003.

BARRETT, Craig F.; PARKER, Matthew A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.1, p.57-65, 2005.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.27, p.462-468, 2004.

BERGEY, D. H.; HOLT, John Caldwell. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

BIANCHETTI, Arnaldo. **Métodos para superar a dormência de sementes de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. Curitiba: EMBRAPA-URPFCS. 1981. 18p.

BRADY, Carrie L.; VENTER, Stephanus N.; CLEENWERCK, Ilse; ENGELBEEN, Katrien; VANCANNEYT, Marc; SWINGS, Jean; COUTINHO, Teresa A. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.59, p.2339-2345, 2009.

BRADY, Carrie L.; CLEENWERCK, Ilse; VENTER, Stephanus N.; ENGELBEEN, Katrien; DE VOS, Paul; COUTINHO, Teresa A. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.60, p.2430-2440, 2010.

BRASIL. Lei nº 11428, de 22 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, 23.12.2006.

CABALLERO-MELLADO, Jesús; MARTÍNEZ-AGUILAR, Lourdes; PAREDES-VALDEZ, Guadalupe; ESTRADA DE LOS SANTOS, Paulina. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.54, p.1165-1172, 2004.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p.1-5, jan-abr. 2003.

CARPANEZZI, A. A.; LAURENT, J. M. E.; CARVALHO, P. E. R.; PEGORARO, A.; BAGGIO, A. J.; ZANON, A.; OLIVEIRA, E. B.; IEDE, E. T.; ROTTA, E.; STURION, J. A.; PEREIRA, J. C. D.; GRACA, L. R.; RAUEN, M. J.; CARPANEZZI, O. T. B.; OLIVEIRA, Y. M. M. **Manual Técnico da Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ. 1988. 70p.

CARVALHO, P.E.R. & COSTA, J.M. Comportamento de essências florestais em condições de arboreto em quatro locais de estado de Paraná:

”Bracatinga, uma alternativa para reflorestamento” In: **SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS**, Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, p. 161-170, 1981.

CARVALHO, P. E. R. *Mimosa scabrella* Bentham. In: **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, p.344-347, 1994.

CHEN, Wen-Ming; de FARIA, Sergio M.; JAMES, Euan K.; ELLIOTT, Geoffrey N.; LIN, Kuan-Yin; CHOU, Jui-Hsing; SHEU, Shih-Yi; CNOCKAERT, M.; SPRENT, Janet I.; VANDAMME, Peter. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.57, p.1055-1059, 2007.

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

CHEN, Wen-Ming; JAMES, Euan K.; COENYE, Tom; CHOU, Jui-Hsing; BARRIOS, Edmundo; de FARIA, Sergio M.; ELLIOTT, Geoffrey N.; SHEU, Shih-Yi; SPRENT, Janet I.; VANDAMME, Peter. *Burkholderia mimosarum* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.56, p.1847-1851, 2006.

CHEN, W. M.; LAEVENS, 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**, London, v.51, p.1729-1735, 2001.

COENYE, Tom; LAEVENS, Severine; WILLEMS, Anne; OHLÉN, Maria; HANNANT, Wendy; GOVAN, John R. W.; GILLIS, Monique; FALSEN,

Enevold; VANDAMME, Peter. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.51, p.1099-1107, 2001.

COENYE, Tom; VANDAMME, Peter. Minireview - Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 719-729, 2003.

COMPANT, Stéphane; NOWAK, Jerzy; COENYE, Tom; CLÉMENT, Christophe; BARKA, Essaïd Ait. Review Article - Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, p.607-626, 2008.

de FARIA, Sergio M.; HAY, Gordon T.; SPRENT, Janet I. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benthham occurs between epidermal cells. **Journal of General Microbiology**, London, v.134, p.2291-2296, 1988.

DELÉTOILE, Alexis; DECRÉ, Dominique; COURANT, Stéphanie; PASSET, Virginie; AUDO, Jennifer; GRIMONT, Patrick; ARLET, Guillaume; BRISSE, Sylvain. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.47, n.2, p.300-310, 2009.

DROZDOWICZ, Adam. Bactérias do solo. In: VARGAS, Milton Alexandre Teixeira; HUNGRIA, Mariangela. (Eds.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.19-65.

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

FRANCO, Avílio A.; NEVES, Maria Cristina P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; TSAI, Siu Mui; NEVES, Maria Cristina Prata. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.219-230.

FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology** - with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 143p.

GORIS, Johan; VOS, Paul De; CABALLERO-MELLADO, Jesús; PARK, Joonhong; FALSEN, Enevold; QUENSEN III, John F.; TIEDJE, James M.; VANDAMME, Peter. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.54, p.1677-1681, 2004.

HAMMER, O. HARPER, D.A.T; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Eletrônica* 4, n.1, 2001. 9p.

HUNGRIA, Mariangela. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, Mariangela; ARAÚJO, Ricardo S. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 542p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46).

HUNGRIA, Mariangela; STACEY, Gary. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.29, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton A. T.; ARAUJO, Ricardo, S. Fixação Biológica do Nitrogênio em Feijoeiro. In: VARGAS, Milton Alexandre Teixeira; HUNGRIA, Mariangela. (Eds.) **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.188-294.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. **A fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 35 - Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

IBAÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.32, p.49-55, 2009.

LEITÃO, Maria Rita Scotti Muzzi M. Fixação Biológica do Nitrogênio por Espécies Arbóreas. In: VARGAS, Milton Alexandre Teixeira; HUNGRIA, Mariangela. (Eds.) **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.153-186.

LIM, Ju Hyoung; BAEK, Sang-Hoon; LEE, Sung-Taik. *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.58, p.565-569, 2008.

LIU, Xiao Yun; WANG, En Tao; LI, Ying; CHEN, Wen Xin. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**, Berlim, v.188, p.1-14, 2007.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. vol 1. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 352p.

MAAYER, Pieter De; CHAN, Wai-Yin; BLOM, Jochen; VENTER, Stephanus N.; DUFFY, Brion; SMITS, Theo H. M.; COUTINHO, Teresa A. Research Article - The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification, 2012. Disponível online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/625>.

MACHADO, Amauri de Almeida; CONCEIÇÃO, Adriano Rochedo. WinStat - Sistema de Análise Estatística para Windows. Versão 1.0. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas - Núcleo de Informática Aplicada. 2003.

MARRA, Leandro Marciano; SOARES, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa; OLIVEIRA, Silvia Maria de; FERREIRA, Paulo Ademar Avelar; SOARES, Bruno Lima; CARVALHO, Renato de Fráguas; LIMA, José Maria de; MOREIRA, Fátima Maria de Souza. Biological nitrogen fixation

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

MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza; SEGOVIA, Lorenzo; MERCANTE, Fabio Martins; FRANCO, Avílio Antonio; GRAHAM, Peter; PARDO, Marco Aurélio. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.41, n.3, p.417-426, 1991.

MARTINS, L. M. V. et al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Brasília: Embrapa, 1997. 14p. (Comunicado Técnico n.19).

MARTINS, M. **Interação entre *Tachardiella* sp. (Homoptera) e *Mimosa scabrella* Benth. (Leguminosae) e a produção de mel de melato por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - UFSC, Florianópolis, SC.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Exploração da bracatinga**. Curitiba: Projeto FAOGCP/BRA/025/FRA (Convênio BRASIL/Paraná-FRANÇA-FAO), 1989. 25p.

MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A. Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium tropici*, *R. etli*, e *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.2, p.301-310, 2000.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbios. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.65-81, 2002.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico. In: MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. p.449-542.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo; BRUSSAARD, Lijbert. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008, p.621-680.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; LIMA, Adriana Silva; JESUS, Ederson da Conceição; SILVA, Krisle da; NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão; FLORENTINO, Ligiane Aparecida. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Atmosférico que Nodulam Leguminosas. In: MOREIRA, Fátima Maria de Souza; CARES, Juvenil E.; ZANETTI, Ronald; STÜRMER, Sidney L. **O Ecossistema Solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2013, p.325-340.

MOULIN, Lionel; MUNIVE, Antonio; DREYFUS, Bernard; BOIVIN-MASSON, Catherine. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v.411, p.948-950, 2001.

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOGUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.63, p.383-400, 2008.

ODUM, Eugene Pleasants. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988. 434p.

ONO, Lucy; WOLLINGER, Wagner; ROCCO, Iray M.; COIMBRA, Terezinha L. M.; GORIN, Philip A. J.; SIERAKOWISKI, Maria-Rita. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 60, p. 201-208, 2003.

OTSUKA, Yuichiro; MURAMATSU, Yuki; NAKAGAWA, Yasuyoshi; MATSUDA, Motoki; NAKAMURA, Masaya; MURATA, Hitoshi. *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.61, p.249-254, 2011.

OYAIKU, H.; MATSUMOTO, S.; MINAMISAWA, K.; GAMOU, T. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.39, p.339-354, 1993.

PETKOWICZ, Carmen L. O.; BOCHICCHIO, Renato.; REICHER, Fany; SILVEIRA, Joana L. M. *Mimosa scabrella*. In: CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. p.656-662.

PROCHNOW, Miriam. **Matas Legais - Planejando Propriedades e Paisagens**. Rio do Sul: Apremavi, 2008, 62p.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S/A, 2001. 728 p.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.54, p.2155-2162, 2004.

REGENSBURGER, Brigitte ; COMIN, Jucinei José ; AUMOND, Juares José. Integração de técnicas de solo, plantas e animais para recuperar áreas degradadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1773-1776, 2008.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; AIT BARKA, E.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R.; WANG-PRUSKI, G.; NOWAK, J. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.55, p.1187-1192, 2005.

SHIRAIISHI, Ayami; MATSUSHITA, Norihisa; HOUGETSU, Taizo. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp.

and Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.33, p.269-274, 2010.

SOARES, André Luis de Lima; PEREIRA, João Paulo Andrade Resende; FERREIRA, Paulo Ademar Avelar; VALE, Helson Mário Martins do; LIMA, Adriana Silva; ANDRADE, Messias José Bastos de; MOREIRA, Fátima Maria de Souza. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG): I - caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, vol.30, n.5, p.795-802, 2006.

SOARES, André Luis de Lima; FERREIRA, Paulo Ademar Avelar; PEREIRA, João Paulo Andrade Resende; VALE, Helson Mário Martins do; LIMA, Adriana Silva; ANDRADE, Messias José Bastos de; MOREIRA, Fátima Maria de Souza. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II - feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, vol.30, n.5, p.803-811, 2006.

SOMASSEgaran, P.; HOBEN, H.J. **Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Hawaii: NIFTAL, 1985. 367p.

STADEN, R., JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach., Totawa, 2003.

STEENBOCK, Walter; PASCHOAL FILHO, Tozelli J.; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Maurício S. dos. *Mimosa scabrella*. In: CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011a. p.478-493.

STEENBOCK, Walter; SIMINSKI, Alexandre; FANTINI, Alfredo Celso; REIS, Maurício Sedrez dos. Ocorrência da Bracatinga (*Mimosa scabrella* BENTH.) em Bracatingais manejados e em florestas secundárias na região do Planalto Catarinense. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.4, p.845-857. 2011b.

STRALIOTTO, Rosângela; RUMJANEK, Norma Gouvea. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 51p.

STRALIOTTO, Rosângela; TEIXEIRA, Marcelo Grandi. **A Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 59p.

STRALIOTTO, Rosângela. Diversidade do Rizóbio – Evolução dos Estudos Taxonômicos. In: AQUINO, Adriana Maria de; ASSIS, Renato Linhares de. (Ed.). **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma Agricultura Sustentável.** Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005a. p.221-255.

STRALIOTTO, Rosângela. Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares no Estudo da Biodiversidade do Rizóbio. In: AQUINO, Adriana Maria de; ASSIS, Renato Linhares de. (Ed.). **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: Ferramentas para uma Agricultura Sustentável.** Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005b. p.281-322.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

VALVERDE, Angel; DELVASTO, Pedro; PEIX, Alvaro; VELÁZQUEZ, Encarna; SANTA-REGINA, Ignacio; BALLESTER, Antonio; RODRÍGUEZ-BARRUECO, Claudino; GARCÍA-BALBOA, Camino; IGUAL, José M. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from na iron ore in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.56, p.2421-2425, 2006.

VANDAMME, Peter; GORIS, Johan; CHEN, Wen-Ming; DE VOS, Paul; WILLEMS, Anne. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia*

phymatum sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.25, p.507-512, 2002.

VANDAMME, Peter; OPELT, Katja; KNÖCHEL, Nadine; BERG, Christian; SCHÖNMANN, Susan; DE BRANDT, Evie; EBERL, Leo; FALSEN, Enevold; BERG, Gabriele. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.57, p.2228-2235, 2007.

VANDAMME, Peter; GORIS, Johan; CHEN, Wen-Ming; de VOS, Paul; WILLEMS, Anne. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.25, p.507-512, 2002.

VEADO, Ricardo Wagner Ad-víncula. **Vegetação de Santa Catarina**. Material da aula ministrada na disciplina de Biogeografia (GCN 3303), do curso de Pós-Graduação em Geografia da Universidade Federal de Santa Catarina, em 23/07/1999.

VERMA, Subhash Chandra; CHOWDHURY, Soumitra Paul; TRIPATHI, Anil Kumar. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.313-322, 2004.

VINCENT, J. M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WANG, En Tao; ROGEL, M. Antonio; GARCÍA-DE los SANTOS, Alejandro; MARTÍNEZ-ROMERO, Julio; CEVALLOS, Miguel A.; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p.1479-1491, 1999.

YABUUCHI E, KOSAKO Y, OYAIZU H, YANO I, HOTTA H, HASHIMOTO Y, EZAKI T, ARAKAWA M. Proposal of *Burkholderia*

gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Taiwan, v.36, p.1251-1275, 1992.

YANG, Hee-Chan; IM, Wan-Taek; KIM, Kwang Kyu; AN, Dong-Shan; LEE, Sung-Taik. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.56, p.453-457, 2006.

ZANON, Ayrton. Métodos de superar a dormência de sementes de Bracatinga para plantio com máquina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.16, p.31-35, dez. 1988.