

MARITHSA MAIARA MARCHETTI

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EM NÓDULOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE FRAGMENTOS DA
FLORESTA OMBRÓFILA MISTA**

**LAGES – SC
2015**

MARITHSA MAIARA MARCHETTI

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EM NÓDULOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE FRAGMENTOS DA
FLORESTA OMBRÓFILA MISTA**

Dissertação apresentada para ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos.

**LAGES – SC
2015**

Marchetti, Marithsa Maiara
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EM NÓDULOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE FRAGMENTOS DA FLORESTA
OMBRÓFILA MISTA/ Marithsa Maiara Marchetti. -
Lages, 2015.

89 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Julio Cesar Pires Santos

Bibliografia: p. 68-79

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo, Lages, 2015.

1. Caracterização morfofisiológica; 2.
Rizóbios; 3. Caracterização genética; 4.
Burkholderia. I. Marchetti, Marithsa Maiara. II.
Santos, Julio Cesar Pires. III. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

MARITHSA MAIARA MARCHETTI

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EM NÓDULOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE FRAGMENTOS DA
FLORESTA OMBRÓFILA MISTA**

Dissertação apresentada para ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Dr. Julio Cesar Pires Santos - UDESC

Membro: _____
Dr. Murilo Dala Costa – EPAGRI / Lages

Membro: _____
Dr. Marcos Roberto Dobler Strochein
IFSC- Urupema

LAGES, 21/12/2015

A minha família por toda dedicação e apoio dado durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a vida, e ter colocado no meu caminho tantas oportunidades maravilhosas e pessoas incríveis aos quais convivi e convivo durante minha existência. Pela família exemplo a qual me colocou que a cada dia me motiva mais para superar os desafios encontrados no caminho.

Ao meu orientador professor Dr. Júlio Cesar Pires Santos, que me proporcionou esse caminho maravilhoso da biologia do solo com seus incansáveis incentivos, atenção e dedicação junto ao estudo.

A minha mãe Marisa, que me ajudou, dando apoio nas coletas e principalmente ofereceu seu ombro amigo me dando forças nesta caminhada, em todas as vezes que desanimei, e sem esquecer dos lanchinhos preparados com muito amor e carinho para os dias de coleta e aula. Sem dúvida alguma eu tenho a melhor mãe, amiga e companheira do mundo.

A minha tia Miria, que muitas vezes me ajudou durante as aventuras de coletas na floresta, contribuindo para minha formação e diversão durante os intervalos de coleta. Sem esquecer dos nossos momentos de avaliação dos sons provenientes da mata, as fotos em locais perigosos. E por todo amor e carinho ao qual me proporciona.

Ao meu namorado Lucas, que entrou no meio disso tudo e conseguiu observar meu nível de stress na reta final e em nenhum momento pensou em desistir, ficou firme me dando incentivo, amor e carinho para eu vencer mais uma etapa na minha vida. Te agradeço por ter entrado na minha vida e me proporcionar momentos maravilhosos. Te amo.

A minha vó e meu vô por todo incentivo, amor e carinho, e gostaria que todo mundo tivesse a oportunidade de ter avós assim, tão presentes e amorosos como vocês. Aos cafezinhos do fim de tarde, quando já estava cansada. Amo vocês muito.

Ao meu tio Valmir e tia Luciana, pelos incentivos, amor carinho e conselhos ao longo dos meus desafios.

Aos amigos e amigas encontrados durante o percurso do mestrado, pessoas maravilhosas que contribuíram significativamente para minha formação humana através das suas amizades: Priscila, Julia, Jaqueline, Antonise, Luara em especial a vocês pela convivência e companheirismo.

Aos meus compadres Tanise, Zé, Everton e Suélin por todo companheirismo e amizade que me fortalece cada dia por ter amigos tão especiais. A minha afilhada Maria Cecília, que veio para abrilhantar ainda mais minha vida e me proporcionar uma gigantesca felicidade.

A professora Ms. Leyza Paloschi de Olivera pela amizade durante todo o percurso, pelo incentivo e ajuda para buscar o melhor, e por deixar meus dias sempre maravilhosos com sua companhia. Você me mostrou como encarar os desafios de maneira simples, e olhar para além das barreiras. Que todas as pessoas tenham a oportunidade de ter amizades maravilhosas como a sua. Obrigada!

A Empresa de Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por ceder a área para a pesquisa, em especial ao Dr. André Biscaia.

A Universidade Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP, por todo apoio durante minha qualificação como profissional da instituição.

A Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, por disponibilizar seu laboratório de biologia molecular para a realização do meu estudo, em especial ao professor Dr. Cesar Baratto que me auxiliou durante as pesquisas moleculares.

“Deixe que seus sonhos sejam maiores que seus medos, e suas atitudes maiores que suas palavras”

(Brenda Oliveira)

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) envolve uma sucessão de processos que começam com a adaptação da bactéria à planta e culminam na fixação do nitrogênio atmosférico, sendo mediada por uma parcela dos procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. O estudo teve por objetivo a caracterização morfofisiológica e genética de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes de sete leguminosas arbóreas florestais. Ao todo, foram obtidos 79 isolados no período do inverno e verão, nas espécies estudadas. Com base nas propriedades morfofisiológicas, os isolados foram classificados em oito grupos. Pela análise do DNA dos isolados após a amplificação com OPA-4 em RAPD, foi possível constatar um grau elevado de diversidade genética, com a obtenção de 19 grupos distintos e, pela amplificação por ERIC obteve-se 18 grupos, ambas com 90% de similaridade. As populações de rizóbios diferiram ainda pela técnica de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S, com a digestão pela endonuclease de restrição *Hinf*I, e foram obtidos 54 grupos com 90% de similaridade, que poderiam indicar a ocorrência de espécies distintas dentro do gênero *Burkholderia* a qual prevaleceu no estudo. Os resultados indicam que a predominância do gênero *Burkholderia* ocorreu devido a versatilidade nutricional e adaptativa do gênero, caracterizando assim o elevado grau de polimorfismo e dominância no estudo.

Palavras-chaves: Caracterização morfofisiológica; Rizóbios; Caracterização genética; *Burkholderia*.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation involves a series of processes beginning with the adaptation of the bacteria to the plant and terminate in fixation of atmospheric N₂, being mediated by a portion of prokaryotes that, though relatively small, exhibits high morphological diversity, physiological, genetic and Phylogenetic. The study aimed to Morphophysiological and genetic characterization of nitrogen fixing bacteria nodulation seven forest legume trees. In all, 79 isolates obtained in winter and summer period, the studied species. Based on the morphological and physiological properties, the isolates were classified into eight groups. For DNA analysis of isolated after amplification with OPA-4 RAPD, there has been a high degree of genetic diversity, obtaining 19 different groups, and for the amplification ERIC gave 18 groups, both with 90% similarity. The populations of rhizobia differ even by PCR-RFLP of the 16S ribosomal gene with the digestion by *Hinf*I restriction endonuclease and were obtained 54 groups with 90% similarity, which could indicate the occurrence of different species within the genus *Burkholderia* the which prevailed in the study. Although there was a predominance genus *Burkholderia*, the results indicate that this predominance was due to nutritional and adaptive versatility of its kind, characterizing the high degree of polymorphism and dominance in the study.

Keywords: Morphophysiological characterization; Rhizobia; Genetic characterization; *Burkholderia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das espécies de leguminosas na FOM – Caçador/SC.....	47
Figura 2 - Exsicatas das leguminosas selecionadas para o estudo.....	48
Figura 3 - Nódulos encontrados em cada uma das espécies durante o período de inverno.....	52
Figura 4 - Nódulos encontrados em cada uma das espécies durante o período de verão.....	53
Figura 5 - Padrões de pares de base encontrados nos isolados usando a técnica de RAPD com os primers OPA-4, OPB-17, P-1251, OPB-17.....	62
Figura 6 - Padrões de banda encontrados nas isolados usando a técnica de RAPD com o primer OPA-4.....	63
Figura 7 - Padrões de banda encontrados nas isolados usando a técnica de ERIC.....	64
Figura 8 - Dendrograma baseado nos pares de base obtidos na amplificação pelo método RAPD com o primer OPA-4, corte de 90% de similaridade.....	65
Figura 9 - Dendrograma baseado nos pares de base obtidos na amplificação pelo método ERIC.....	66
Figura 10 - Padrões de banda encontrados nas espécies usando a endonuclease de restrição <i>Hinfl</i>	68

Figura 11 - Dendrograma baseado nos pares de base obtidos pela clivagem com a endonuclease de restrição *HinfI*, com corte de 90% de similaridade..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características morfofisiológicas dos gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes.....	41
Tabela 2 - Média das características químicas das amostras de solo coletadas em cada planta.....	49
Tabela 3 - Tipos de nódulos encontrados nas espécies durante o período de inverno e verão.....	50
Tabela 4 - Número de isolados por planta durante as estações de inverno e verão.....	54
Tabela 5 - Agrupamento dos isolados obtidos, baseado nas características morfofisiológicas descritas por MOREIRA; HUISING; BIGNELL.....	56

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA.....	21
1.2 DINÂMICA DO NITROGÊNIO COM OS MICROORGANISMOS NO SOLO	22
1.3 INTERAÇÃO LEGUMINOSA-RIZÓBIO.....	26
1.4 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NODULANTES	30
1.5 ANÁLISE MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DE RIZÓBIOS	33
1.5.1 Caracterização de estirpes por meio de rRNA 16S	33
1.5.2 Caracterização de estirpes pelos métodos de RAPD, ERIC e RFLP	34
2 METODOLOGIA	37
2.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES FLORESTAIS	37
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	38
2.3 COLETA DOS NÓDULOS	38
2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS	39
2.5 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS.....	39
2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS	40
2.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO.....	41
2.8 TÉCNICAS MOLECULARES (RAPD-PCR; ERIC-PCR; RFLP).....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS	50
3.1.2 Caracterização dos Isolados Encontrados	54
3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS....	62
4 PERSPECTIVAS FUTURAS	74
5 CONCLUSÃO	75

6 BIBLIOGRAFIA	76
ANEXOS	88

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), também conhecida como mata-de-araucária ou pinheiral, é um tipo de vegetação do planalto meridional, caracterizada pela presença de *Araucaria angustifolia*, *Dicksonia sellowiana* e *Ocotea porosa*, que antigamente apresentava-se multiestratificada, com diferentes padrões fisionômicos e estruturais, porém atualmente esses estratos nem sempre são bem definidos, devido a alta fragmentação e degradação (GASPER et al., 2013) formando assim uma cobertura contínua, dando, muitas vezes a impressão de tratar-se de uma formação uniestratificada (SONEGO; BACKES; SOUZA, 2007).

Com base nos dados do Inventário Florestal Florístico de Santa Catarina, a FOM ocupa cerca de 31% do estado de Santa Catarina sendo a maior de todas as florestas em cobertura no estado (VIBRANS et al., 2013). De acordo com Machado et al. (2009), é uma das tipologias vegetais da região Sul do Brasil com maior riqueza e diversidade de espécies.

Possui uma estrutura complexa e há pouco conhecimento sobre os diversos tipos de comunidades que existem dentro de sua área de distribuição natural (NASCIMENTO et al., 2001). A caracterização dos componentes de uma floresta, assim como dos processos resultantes da interação entre eles, é de fundamental importância para conhecer o seu funcionamento, avaliar as implicações qualitativas e quantitativas da interferência antrópica na sua auto sustentabilidade (WATZLAWICK et al., 2011).

A FOM destaca-se como maior região fitoecológica do estado de Santa Catarina, sendo que nos trabalhos desenvolvidos por MEYER et al. (2013), durante o inventário florestal florístico de Santa Catarina, foram encontradas em

155 unidades amostrais 502 gêneros e 138 famílias botânicas. A família *Fabaceae* foi considerada a terceira maior em riqueza específica, apresentando 58 espécies e também segunda maior riqueza de componentes arbóreos na FOM, apresentando 37 espécies no estado.

A FOM presente na Reserva Florestal da Embrapa/Epagri localiza-se no município de Caçador, região centro-oeste do Estado de Santa Catarina, situando-se entre as coordenadas geográficas 50° 05' e 51° 00' de longitude Oeste de Greenwich e de 26° 50' e 26° 55' de latitude Sul, com altitude que varia de 900 a 1050 metros, nos planaltos elevados do Rio Uruguai no Alto Vale do Rio do Peixe. Possui um clima mesotérmico, subtropical úmido sem estação seca, com verões frescos. É uma região de ocorrência de clima temperado úmido, apresentando invernos rigorosos com geadas severas. A temperatura média anual é de 16,6°C, sendo a máxima média de 22,5°C e a mínima média de 11°C, e temperatura absoluta máxima de 38°C e mínima de -14°C, e com uma precipitação média anual de 1.613,1 mm (KURASZ et al., 2004).

1.2 DINÂMICA DO NITROGÊNIO COM OS MICRORGANISMOS NO SOLO

Diversos processos bioquímicos são mediados por microrganismos no solo que desempenham assim um papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos (MOREIRA et al.; 2010). O nitrogênio (N) compõe aproximadamente 75% da atmosfera, entretanto os animais e as plantas não podem absorvê-lo diretamente do ar na forma de gás. Geralmente as formas disponíveis de nitrogênio para a nutrição dos seres vivos incluem as combinações amoniacais, nítricas ou orgânicas que são

metabolizadas visando a construção de biomassa (LESSA, 2007).

O nitrogênio é um macronutriente e está entre os quatro elementos essenciais a vida, pois está presente nos aminoácidos, proteínas, DNA, RNA e em outras estruturas celulares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). A disponibilidade biológica do nitrogênio no solo, juntamente com o fósforo, enxofre e potássio tem relação direta com a produtividade agrícola (LESSA, 2007).

Tanto a dinâmica dos ecossistemas terrestres, como a produtividade agrícola, está limitada à disponibilidade de nutrientes. Com relação às plantas, a disponibilidade de nitrogênio é o principal fator limitante para produtividade e desenvolvimento, juntamente com o fósforo. Para que se consiga um incremento desses nutrientes no solo, tem se adotado a utilização de fertilizantes químicos; porém além de ser uma prática com altos custos, ainda agrega severas consequências ambientais, tanto na produção, quanto no destino final (RINCÓN; GUTIÉRREZ, 2012).

Diante das sérias consequências que o uso de insumos químicos tem acarretado aos ecossistemas, a ideia da conservação ambiental e o uso racional de seus recursos tem ganhado bastante relevância. A perda de diversidade de microrganismos do solo, principalmente dos diazotróficos, pode alterar a estrutura populacional de outros organismos situados ao longo da cadeia trófica. Diante dos fatores, os processos vitais do solo tais como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, podem sofrer impactos, levando o sistema agrícola à maior dependência por fertilizantes (MOREIRA et al., 2010).

As interações específicas entre plantas e microrganismos possuem um forte impacto sobre o funcionamento dos ecossistemas, e conseqüentemente nos ciclos biogeoquímicos, sendo que a disponibilidade dos nutrientes no solo está envolvida com seus diferentes arranjos

químicos até a incorporação na biomassa microbiana. Diferentes formas de vida participam ativamente na dinâmica desses elementos no solo, sendo que uma delas, podendo assim dizer a principal, são as comunidades microbianas. Os microrganismos disponibilizam esses elementos para as plantas por meio de transformações químicas; sendo assim, o composto que estava imobilizado passa a ficar disponível para a nutrição da planta (RINCÓN; GUTIÉRREZ, 2012).

Na natureza, o N apresenta um grande número de transformações mediadas por microrganismos específicos, visando a adição ou manutenção das formas de nitrogênio disponíveis no solo. Os microrganismos diazotróficos que atuam na fixação biológica do nitrogênio podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, tanto naturais como também aos manejados, atuando de forma significativa em recuperação de áreas degradadas (MOREIRA et al., 2010).

A fixação de nitrogênio pode ser realizada por processos industriais, que demandam alto custo e uso de recursos não renováveis, e pelos microrganismos que fixam nitrogênio atmosférico. A função de transformar o nitrogênio existente no ar atmosférico em formas assimiláveis para plantas e animais, é realizada por bactérias que possuem a enzima nitrogenase, enzima esta que é composta por duas unidades, uma delas é o ferro-proteína e a outra o ferro-molibdênio (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008).

De acordo com MOREIRA et al. (2010), os diazotróficos compreendem ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante não só a

resiliência dos processos de um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes habitats terrestres. A dinâmica do ciclo do N em ecossistemas, compreende basicamente os processos de fixação, mineralização, nitrificação e desnitrificação, processos esses mediados por ação dos microrganismos presentes nos solos.

Fatores naturais como mudanças climáticas, condições geográficas, profundidade, propriedades químicas, físicas e biológicas podem interferir na atividade microbiana no solo, assim como os fatores antropogênicos, a exemplo: a contaminação do solo pelo manejo agrícola (RINCÓN; GUTIÉRREZ, 2012). Assim como os demais microrganismos, os rizóbios possuem condições básicas para sua sobrevivência, como, por exemplo, faixas de tolerâncias para temperatura e pH, sendo que esses fatores de natureza físico-química podem influenciar tanto no número como na atividade enzimática dos microrganismos (OLIVEIRA; FLOR; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com FAGAN et al. (2007), a FBN envolve uma sucessão de processos que começam com a identificação da bactéria pela planta e culminam na fixação do N₂ atmosférico. A nodulação inicia aproximadamente 2 h após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora. O processo de infecção pelo rizóbio envolve diferentes agentes sinalizadores entre a planta e a bactéria.

De acordo com KAMICKER & BRILL, (1986), alguns fatores são determinantes na nodulação ou fixação biológica do N₂ por leguminosas sendo a tensão da água, teor de O₂ no nódulo, temperatura e pH do solo, salinidade, toxinas e predadores os principais que podem atuar junto à vasta variedade de estirpes de rizóbio que se encontram no solo.

O efeito da disponibilidade hídrica no transporte de sacarose e compostos nitrogenados pode influenciar a atividade

nodulífera, pois o balanço de água via transporte simplasto e apoplasto altera a pressão de turgor das células e provavelmente tem influência na permeabilidade da membrana do nódulo a gases, principalmente o oxigênio (FAGAN et al., 2007).

O estresse hídrico afeta a atividade da nitrogenase de duas formas: primeiramente, limita a disponibilidade de oxigênio na zona do bacteróide restringindo a respiração e a segunda, pela diminuição da síntese de leghemoglobina, acúmulo de urédeos e aspartato nas folhas e nódulos devido ao decréscimo no fluxo de água no floema (HUNGRIA; VARGAS, 2000).

Em relação a alguns nutrientes, de acordo com VALDEZ et al. (2000), o manganês tem papel fundamental na catálise de vários processos enzimáticos e de transferência de elétrons, sendo que o Mn^{++} pode regular a FBN em condições de seca, ou seja, em condições de estresse hídrico. De acordo com ISRAEL (1987) o fósforo tem influência na iniciação, crescimento e funcionamento dos nódulos, altos requerimentos de fósforo são necessários para a FBN, de forma que o aumento do suprimento de fósforo promove incremento na atividade e no acúmulo de fitomassa seca do nódulo. O molibdênio é um elemento importante no metabolismo do nitrogênio por fazer parte do complexo enzima nitrogenase e redutase do nitrato. O cobalto faz parte de precursores da leghemoglobina, portanto, também está associado à FBN. (BURRIS, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004).

1.3 INTERAÇÃO LEGUMINOSA-RIZÓBIO

A família *Fabaceae* possui cerca de 750 gêneros e 18.000 espécies conhecidas, sendo divididas em três subfamílias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*. As espécies podem ser encontradas na forma de herbáceas, arbustos e árvores, sendo que o índice nodulífero é maior nas

duas últimas subfamílias. A maior parte dos nódulos é formada no sistema radicular, porém algumas espécies podem formar nódulos no caule, esses geralmente em situações de alagamento (HUNGRIA, 1994).

A maioria das espécies não nodulíferas são da família *Caesalpinioideae*, onde 76% das espécies analisadas desta família não possuem capacidade nodulíferas. Nas famílias *Mimosoideae* e *Papilionoideae* apenas 11% e 4% respectivamente são incapazes de estabelecer simbiose com rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Em um estudo feito por CANOSA; FARIA; MORAES (2011), no estado do Rio de Janeiro, foram encontrados 45 gêneros que possuem registro de nodulação. No entanto, das 269 espécies contidas nesses gêneros, apenas 46,4% têm registro para nodulação, sendo mais expressiva a nodulação em *Mimosa*, *Inga* e *Chamaecrista*.

Em estudos com 100 espécies de acordo com SOUZA et al. (1994), de 55 gêneros, obtiveram 63% das espécies com capacidade de formar nódulos radiculares. Os nódulos foram observados em 97% das *Papilionaceas*, 67% das *Mimosaceas* e em apenas 32% das *Caesalpinaceas*.

SOUZA (2010), em suas pesquisas feitas na Amazônia, identificou vinte novos registros sobre a capacidade nodulífera de espécies, sendo 10 gêneros nodulíferos e 10 não nodulíferos. Como novos gêneros nodulíferos apontou *Abarema*, *Acosmium*, *Campsiandra*, *Cedrelinga*, *Dicorynea*, *Etaballia*, *Plathymenia*, *Poecilanthé*, *Vouacapoua* e *Zollernia* e como não nodulíferos *Aldina*, *Bocoa*, *Dinizia*, *Dipteryx*, *Elizabetha*, *Heterostemon*, *Lecointea*, *Marmaroxylon*, *Monopteryx* e *Taralea*. Em seu trabalho, constatou também que 22 gêneros de *Fabaceae* ainda estão indefinidos em sua capacidade de nodular e fixar N₂, estimando-se que 67% das *Fabaceae* amazônicas não foram avaliadas quando a FBN.

A associação ente bactérias e leguminosas reflete parâmetros evolutivos entre os hospedeiros, pelo

reconhecimento de sinais moleculares e especificidade simbiótica (SOUZA et al., 2007). De acordo com RÍNCON (2012), as plantas selecionam e estimulam as comunidades microbianas que ficaram em sua rizosfera através da produção e liberação de exsudados radiculares.

Esses procariotos que fazem a FBN são considerados uma parcela relativamente pequena de organismos, apresenta grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Essas bactérias diazotróficas são classificadas em quatro grupos: heterotróficas, fototróficas anoxigênicas, archeabacteria e cianobactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A maioria dessas espécies de bactérias diazotróficas são encontradas com modo de vida livre, ocorrendo em diversos solos na rizosfera de plantas; algumas ainda podem ser encontradas em simbiose com fungos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). As bactérias denominadas rizóbio são consideradas o principal grupo de diazotróficos, por sua importância agrônômica devido a fixação de nitrogênio. O segundo grupo economicamente mais importante é composto por cianobactérias e o terceiro grupo é representado pela associação simbiótica entre actinomicetos e plantas de várias famílias (SPRENT & SPRENT, 1990).

As bactérias diazotróficas assumem papel fundamental promovendo o crescimento vegetal tanto pela FBN, como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como por exemplo o ácido indol acético, hormônio vegetal auxina que é conhecido por produzir tanto respostas rápidas, aumento da alongação celular e lentas, divisão e diferenciação celular (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), entre outros compostos que auxiliam na promoção de crescimento vegetal. Assim, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e assumem papel importante na interação

com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros (MOREIRA et al., 2010).

A associação mais conhecida é entre bactérias da família *Rhizobiaceae* e várias espécies da família *Fabaceae* que podem ser verificadas através da formação de estruturas hipertróficas nas raízes, denominadas nódulos. Estas bactérias alcançam o sistema radicular das leguminosas e penetram através dos pelos absorventes, instalam-se nos tecidos corticais das raízes e ali se desenvolvem, fixando o nitrogênio atmosférico e transformando-o em NH_4^+ que são utilizados pelas plantas, funcionando como um verdadeiro adubo vivo (LESSA, 2007). Dentro dos nódulos, os rizóbios fazem a transformação do N_2 atmosférico para amônio, com a ajuda da enzima nitrogenase. O nódulo forma um nicho anaeróbico para transformação do nitrogênio, protegendo a nitrogenase de ser inativada pelo oxigênio. Posteriormente, o amônio é transportado dos nódulos para a planta hospedeira e em troca, a planta fornece fontes de carbono para o bacterióide (MARIN et al., 2003).

De acordo com JANCZAREK et al. (2014), os mecanismos pelos quais as leguminosas permitem que os rizóbio infectem as raízes e promovam a formação de nódulos possuem alta complexidade de interação, devido a presença de muitas moléculas de sinalização e proteínas reguladoras envolvidas nas várias etapas da rede de sinalização para a criação desses novos “órgãos” na planta, proporcionando um nicho ecológico único para o processo simbiótico.

De acordo com MAUNOURY et al. (2008), a simbiose para a fixação de nitrogênio ocorre por três processos primordiais, onde inicia-se pela infecção intracelular, sendo que o processo de infecção na maioria das leguminosas é iniciado na epiderme, através dos pêlos radiculares. Após adesão a esses pêlos radiculares, os microrganismos fazem a organogênese do nódulo, onde induzem a deformação e ondulação, proporcionando então o aprisionamento da bactéria

dentro da cavidade curvada, e uma pequena colônia de rizóbios é formada. As bactérias provocam a degradação local nas células da epiderme e criam uma estruturatubular, chamado de canal de infecção, por meio do qual irão ocorrer as trocas nutricionais (JANCZAREK et al., 2014) e por fim culminam na fixação de nitrogênio.

Para que essa aproximação e formação do nódulo ocorra, inúmeros sinais bioquímicos são liberados pelo microrganismo e pela planta hospedeira, ocorrendo assim um diálogo a nível molecular entre os simbioss. Flavonoides específicos, são exsudados pelas raízes de leguminosas, e são percebidos por rizóbios na rizosfera, através dos seus receptores putativos. Cada espécie de rizóbios possui seu próprio conjunto de genes de nodulação, cinco dos quais (nodABCIIJ) são comuns para todos e as plantas hospedeiras têm receptores específicos para os fatores Nod de seus parceiros simbióticos compatíveis (MAUNOURY et al; 2008).

Além de serem fatores de reconhecimento para a nodulação, o conjunto de genes Nod pode também intervir na morfologia do nódulo, podendo ativar células corticais opostas do local de infecção, levando assim a diferenciação e divisão do nódulo. Com isso, quando o nódulo se origina no córtex interno, ele dá origem a nódulos indeterminados; e quando originado no córtex externo, dá origem a nódulos determinados (MAUNOURY et al; 2008).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NODULANTES

As bactérias fixadoras de nitrogênio ou bactérias diazotróficas, são bastonetes gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são identificados genericamente como rizóbio (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001).

Por muitos anos, a caracterização das espécies de rizóbio foi baseada na capacidade específica da bactéria nodular a planta hospedeira, na qual cada isolado de rizóbio tinha um determinado grupo de hospedeiros, ou seja, nodulava certas leguminosas. Com o passar do tempo foram ocorrendo mais estudos e mudando a maneira de classificação desses organismos. Os novos métodos taxonômicos desenvolvidos para comparar estipes, com bases em diferentes características, resultaram em agrupamentos cada vez mais distantes daqueles baseados na capacidade específica da bactéria para nodular a planta hospedeira (VIEIRA, 2007).

Ocorreu então a classificação em dois grupos, sendo eles rizóbio de crescimento lento e de crescimento rápido. O gênero *Rhizobium* é de crescimento rápido e promove queda no pH quando em meio de cultura, porém quando há presença de sacarose, glutamato monossódico e extrato de levedura eles demonstram comportamento inverso. O gênero *Bradyrhizobium* possui o crescimento lento e produz reação básica no meio de cultura (URENHA et al., 1994). O progresso na taxonomia rizobiana levou à descrição de mais de 40 novas espécies e a distinção em cinco gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* (VIEIRA, 2007).

Segundo ROCHA (2007), recentemente foram descobertas espécies de β -proteobactérias que formam nódulos funcionais em leguminosas tropicais, pertencentes a família *Burkholderiaceae*, sendo estirpes de *Burkholderia*, e estirpe de *Ralstonia taiwanensis*, isolados de *Aspalathus carnosae*, *Machaerium lunatum* e *Mimosa pudica*, respectivamente. A maioria das espécies da família *Rhizobiaceae* descritas até hoje foram isoladas de leguminosas herbáceas de interesse econômico, tais como feijão e soja, com poucas espécies descritas de rizóbios isolados a partir de leguminosas herbáceas e arbóreas tropicais (SPRENT, 2001).

De acordo com MOREIRA; HUISING; BIGNELL (2010) existem oito gêneros de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio nodulantes, sendo eles: *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradhyrizobium*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus* e *Burkholderia*.

As características morfofisiológicas observadas nos gêneros *Allorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* são colônias com diâmetro de 2-4 mm, que geralmente coalescem devido a abundante produção de exopolissacarídeos sendo convexas, semitranslúcidas e mucilaginosas. Podendo apresentar o centro da colônia amarelado devido a absorção do indicador, possuem crescimento rápido (2-3 dias) e acidificam o meio de cultura. Colônias de *Mesorhizobium*, apresentam as mesmas características do *Rhizobium*, porém possuem crescimento intermediário de suas colônias, variando de 4 a 5 dias (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

As colônias de *Bradhyrizobium* não excedem 1 mm de diâmetro, possuem de pouca a abundante produção de exopolissacarídeos, apresentam crescimento lento sendo igual ou maior que 10 dias, são opacas, brancas e convexas, de textura granular, alcalinizam o meio de cultura, algumas colônias ainda podem apresentar crescimento em 6 dias. O gênero *Azorhizobium* apresenta colônias com 0,5mm de diâmetro e coloração creme clara, produzindo muito pouco exopolissacarídeos, sendo menos que o gênero *Bradhyrizobium* e reação alcalina no meio, suas colônias apresentam crescimento rápido a intermediário sendo de 3-4 dias (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

As espécies pertencentes ao gênero *Cupriavidus* possuem características similares ao *Azorhizobium*, com produção de exopolissacarídeos ligeiramente maior, mas ainda menor que o *Bradhyrizobium*. E as colônias de *Burkholderia* apresentam características similares aos gêneros de crescimento rápido, exceto na modificação do pH do meio, pois elas podem produzir reação ácida e alcalina ao mesmo

tempo ou dependendo da idade (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

1.5 ANÁLISE MOLECULAR COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DE RIZÓBIOS

Em 1985 foi desenvolvida a técnica de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), permitindo a produção de grandes quantidades de um determinado segmento de DNA a partir de apenas uma molécula de DNA, sem a necessidade da introdução dessa molécula em bactérias. É uma técnica rápida e fácil de ser aplicada para as mais diversas áreas de estudos moleculares. Na amplificação do DNA através da PCR, a DNA polimerase é capaz de fazer pequenos reparos no DNA e também replicá-lo, podendo assim alongar *in vitro* um pequeno oligonucleotídeo (primer), adicionando nucleotídeos em sua sequência (LOUREIRO, 1994 & OLIVEIRA, et al., 2007).

O processo de amplificação envolve basicamente três passos: em um primeiro momento o DNA contendo a sequência a ser amplificada será desnaturado pelo calor, no segundo momento, esse DNA desnaturado será anelado pelo excesso de oligonucleotídeos e no terceiro momento, a DNA polimerase faz a replicação do segmento de DNA a partir das terminações livres dos oligonucleotídeos (LOUREIRO, 1994).

Os produtos do primeiro ciclo de replicação são, então, desnaturados, anelados pelos oligonucleotídeos, e replicados novamente com o DNA polimerase. O ciclo se repete por muitas vezes, até se obter um nível desejado de amplificação ocorrer (LOUREIRO, 1994).

1.5.1 Caracterização de estirpes por meio de rRNA 16S

A taxonomia dos rizóbios tem se desenvolvido rapidamente e têm sido descritas muitas espécies e gêneros novos com a ajuda da engenharia genética presente nesses

procariotos (ROCHA, 2007). Os ribossomos procarióticos consistem de três moléculas de RNA (5S, 16S e 23S) de diferentes tamanhos e cerca de 50 proteínas ribossomais. A molécula do rRNA 16S contém cerca de 1.540 pares de nucleotídeos (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

As moléculas de rRNA apresentam regiões extremamente conservadas entre todos os organismos que compartilham aquela espécie de rRNA e regiões altamente variáveis, sendo que o grau de variação nessas regiões específicas pode ser maior ou menor de um táxon a outro. Assim, o fato de estas moléculas possuírem sítios de rápida e outros de lenta evolução permitem que se avaliem as relações filogenéticas tanto entre organismos muito proximamente relacionados quanto entre os filogeneticamente muito distantes (WOESE, 1987).

STRALIOTTO; RUMJANEK (1999), afirmam que a caracterização da sequência do rRNA 16S tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos. A amplificação direta via reação em cadeia da polimerase (PCR) do rRNA 16S tornou possível, por exemplo, o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (WARD; WLLER; BATESON, 1990). Comparações entre as sequências de nucleotídeos completas ou parciais do rRNA 16S tem sido amplamente utilizada para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de rizóbios (JARVIS; DOWNER; YOUNG, 1992; BARRERA et al., 1997).

1.5.2 Caracterização de estirpes pelos métodos de RAPD, ERIC e RFLP

A técnica de polimorfismo de DNA amplificado por acaso (RAPD) é uma variação da PCR, que gera impressões digitais (“fingerprints”) com um único oligonucleotídeo sintético (primer). Como o oligonucleotídeo apresenta

sequência nucleotídica arbitrária, o RAPD não requer nenhuma informação sobre a sequência do DNA a ser simplificada, apresentando dessa forma vantagens também em relação ao Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), sendo menos dispendioso, mais rápido, requer uma quantidade menor de DNA, além de ser fácil a sua manipulação (LOUREIRO, 1994). É capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas, baseando-se na amplificação de fragmentos não específicas de DNA. Essas sequências de primers geradas arbitrariamente permite a observação de perfis de RAPDs com vários produtos de amplificação, decorrentes dos vários sítios homólogos a esses primers espalhados, auxiliando assim na identificação de diferentes níveis taxonômicos (REIS JUNIOR et al., 2002).

A técnica de ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) também é uma modificação da técnica de PCR, a qual consiste na amplificação de PCR com a utilização de primers que amplificam sequências repetidas (MEHTA; MEHTA; ROSATO, 2003). O conjunto de primers utilizados por essa técnica é mais sensível a condições subótimas da PCR, porém gera padrões de bandamento altamente discriminatórios (REIS JUNIOR et al., 2002).

Marcadores moleculares, como o RFLP (restriction fragment length polymorphisms) têm sido extensivamente usados em estudos genéticos de plantas e microrganismos. O método utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA em regiões específicas, produzindo assim os fragmentos de restrição, sendo estes de vários tamanhos, podendo assim serem separados no gel de agarose (LOUREIRO, 1994).

As enzimas de restrição são endonucleases que reconhecem e rompem as ligações de fosfato de sequências específicas de DNA, porém essas endonucleases de restrição não cortam quando a sequência específica de DNA for metilada por uma metilase. Diferentes espécies e cepas de bactérias contém pares únicos de sistemas de

restrição/metilação. Desta forma, o DNA de outro organismo que invade uma bactéria é rapidamente degradado enquanto que o DNA do hospedeiro que é metilado, não é degradado (REIS JUNIOR et al., 2002).

Segundo ROSADO et al. (1997), as moléculas das diferentes espécies de rRNA são particularmente importantes nos estudos de ecologia microbiana, sendo que são consideradas cronômetros moleculares nos estudos de evolução, pois preenchem todos os requisitos que definem um marcador filogenético.

O estudo com rizóbios tem sido cada vez mais intenso, já que os mesmos possuem grande importância ecológica e econômica; no entanto a nodulação tem sido avaliada em uma pequena parte apenas das leguminosas, cerca de 10% (MOREIRA, 2008).

Diante disso não existem dúvidas de que a ocorrência e diversidade dessas bactérias ainda tem que ser explorada, assim sendo, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar morfofisiologicamente e geneticamente as bactérias fixadoras de nitrogênio encontradas em nódulos presentes em espécies arbóreas de leguminosas da família *Fabaceae*, ocorrentes na Floresta Ombrófila Mista.

2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado na Floresta Ombrófila Mista da Reserva Florestal Embrapa/Epagri, localizada entre as coordenadas geográficas 26°50'32,69" e 26°52'36,73" latitude sul e 50°54'51,69" e 51°58'40,36" longitude oeste, região centro-oeste do estado de Santa Catarina. A reserva compreende uma área de 1.194 hectares (KURASZ, 2005).

2.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES FLORESTAIS

Inicialmente realizou-se o levantamento sobre as espécies de leguminosas arbóreas existentes na Floresta Ombrófila Mista, por meio de revisão bibliográfica com base no Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (MEYER et al. 2013), o qual já contém dados das espécies de leguminosas arbóreas encontradas na região meio-oeste do estado de Santa Catarina.

O Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina apontou 13 espécies de leguminosas, entre arbóreas e arbustivas, das quais foram selecionadas as 7 espécies de porte arbóreo, demarcando-se 5 exemplares cada espécie para as avaliações. Para a identificação dessas plantas, foram coletadas folhas (organização), flores e frutos, confeccionadas exsiccatas de cada espécie e encaminhadas para identificação ao herbário da UDESC.

As sete espécies arbóreas selecionadas e identificadas para a pesquisa da ocorrência de bactérias nodulíferas foram: *Mimosa scabrella*, *Mimosa flocculosa* (em plantio), *Inga lentiscifolia*, *Inga* sp, *Machaerium brasiliense*, *Machaerium stipitatum* e *Bauhinia forficata*.

A ocorrência de bactérias em nódulos radiculares na *Mimosa scabrella* foi realizada em um sistema de plantio e um de ocorrência natural.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

Para obter parâmetros químicos do solo e correlacionar com a ocorrência dos microrganismos presentes na área, foram feitas coletas de solo para cada uma das plantas amostradas, onde delimitou-se um círculo ao redor, correspondente a aproximadamente 1,5 m de raio sob a copa da planta, e posteriormente foram abertas pequenas trincheiras com o auxílio do trado, com profundidade de 10 cm em 4 pontos ao redor da planta e retiradas as amostras de solo. Posteriormente foram homogeneizadas manualmente e acondicionadas em sacos de papel, para as análise físico-química (pH, macro e micronutrientes, CTC, matéria orgânica, argila) a metodologia foi seguida conforme descrito por TEDESCO; et al. (1995).

2.3 COLETA DOS NÓDULOS

A metodologia utilizada foi a descrita por HUNGRIA (1994). A coleta dos nódulos radiculares foi realizada em 5 exemplares de cada espécie em dois períodos, sendo caracterizada como inverno (agosto) e verão (novembro). Para a coleta das raízes com nódulos delimitou-se um círculo ao redor da planta, correspondente a aproximadamente 1,5 m de raio sob a copa da planta, e posteriormente foram abertas pequenas trincheiras de 40x40cm com profundidade de 10 cm em 4 pontos ao redor da planta e coletado as raízes com os nódulos. Após a coleta foi removido o excesso de solo das raízes e as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, e colocadas em caixas de isopor para evitar o ressecamento.

Após a coleta de campo, as raízes com nódulos foram levadas ao laboratório de microbiologia da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP, lavadas cuidadosamente em água corrente sobre uma peneira, para evitar a perda de nódulos que possam vir a se desprender durante o processo de

lavagem, e posteriormente foram secas em papel toalha. Na sequência procedeu-se o isolamento das bactérias presentes nos nódulos.

2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS

Para a caracterização dos nódulos, os mesmos foram classificados em determinados para aqueles que apresentavam morfologia sem ramificações e/ou esféricos e indeterminados para aqueles que possuíam ramificações e/ ou cilíndricos em sua estrutura, seguindo a ideia descrita por MAUNOURY et al. (2008).

2.5 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS

Para o isolamento dos microrganismos foi seguida a metodologia descrita por HUNGRIA (1994). Após a lavagem das raízes, foram selecionados 5 nódulos de cada uma das repetições de cada espécie. Cada nódulo foi acondicionado em um béquer com o auxílio de uma pinça, e submetidos ao processo de desinfecção com álcool 70%, por um minuto e solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos. Em seguida cada um desses nódulos foi lavado com água destilada estéril 6 vezes para retirar o hipoclorito de sódio. Posteriormente os nódulos foram macerados com um bastão de vidro e inoculados em placas contendo meio seletivo de extrato de levedura-manitol-ágar (YMA), com temperatura de 28°C por um período de 10 dias.

Na sequência procedeu-se o procedimento de purificação seriada para a obtenção de cultura pura e observação das características morfofisiológicas dos isolados. Nesta etapa parte das placas com meio de cultura YMA recebeu a adição do corante vermelho-congo e a outra parte

recebeu o corante azul de bromotimol, sendo que o vermelho-congo facilita a identificação de contaminantes, que irão absorver a cor vermelha enquanto colônias de rizóbio não absorvem, e o azul de bromotimol permite a identificação de acidificação ou alcalinização do meio ocorrendo mudança de cor para amarela ou azul.

Após a segunda inoculação, os microrganismos foram incubados a uma de temperatura de 28°C, e avaliados em relação a suas características morfofisiológicas com 4 dias, 7 dias e 10 dias para aqueles que não apresentaram crescimento até o sétimo dia.

2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para a caracterização dos microrganismos realizou-se a avaliação morfofisiológica das culturas obtidas, sendo observadas as seguintes características descritas por ARAÚJO (1994): Transparência (translúcida ou opaca); Cor da colônia (branca, amarela ou rosa); Tamanho (<1 mm ou >1 mm); Borda (lisa, rugosa); Elevação (achatada, cupular ou convexa); Taxa de crescimento [(rápido (3 dias), intermediário (4 a 7 dias) e lento (8 a 10 dias)]; Forma (circular ou puntiforme); Exopolissacarídeos (tipo 1-pouco, tipo 2-médio, tipo 3-muito ou tipo 4-abundante); pH (ácido, neutro ou básico), característica avaliada com três, sete e dez dias.

Com essas informações as bactérias foram agrupadas por amostra de planta coletada e pelas características culturais comuns aos gêneros e separadas por período. Para garantir a manutenção dos isolados até sua caracterização molecular procedeu-se a liofilização das bactérias.

A tabela 01 reúne oito gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, cinco deles de crescimento rápido (*Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Burkholderia*), um de crescimento rápido a intermediário (*Azorhizobium*), um

de crescimento intermediário (*Cupriavidus*) e um de crescimento lento (*Bradhyrhizobium*). De um modo geral, aqueles que possuem crescimento rápido acidificam o meio de cultura, e os que possuem crescimento lento alcalinizam o meio de cultura. Porém, o gênero *Burkholderia*, possui capacidade para acidificar ou alcalinizar o meio de cultura, dependendo da idade (MOREIRA, 2010).

Tabela 01. Características morfofisiológicas dos gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes.

Gênero	Transp.	Cor	Tamanho	Borda	Elevação	Taxa de Cresc.	Forma	Muco	pH
Allorhizobium Rhizobium Sinorrhizobium	ST	A	2-4mm	L	Cv	R	Ci	3	AD
Mezorhizobium	ST	A	2-4mm	L	Cv	R	Ci	3	AD
Bradhyrhizobium	O	B	1<	L	Cv	L	P	1 á 2	BS
Azorhizobium	O	C	0,5mm	L	Cv	R á l	P	1	BS
Cupriavidus	O	C	0,5mm	L	Cv	I	P	1	BS
Burkholderia	ST	A	2-4mm	L	Cv	R	Ci	3	AD /BS

Fonte: MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010.

Legenda: **Transparência:** ST – semitranslúcidas; O – opacas; **Cor:** A – amarelada; B – branca; C – creme; **Borda:** L – lisa; R – rugosa; **Elevação:** Ac – achatada; Cp – cupular; Cv - cônvexa; **Taxa de crescimento:** R - rápido (3 dias); I – intermediário (4 a 7 dias); L – lento (8 a 10 dias); **Forma:** Ci – circular; P – puntiforme; **Muco:** 1 – pouco; 2 – médio; 3 – muito; 4 – abundante; **pH:** AD – ácido; N – neutro; BS – básico;

2.7 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Para a extração do material genético foi selecionado um isolado proveniente de cada grupo resultante no agrupamento com base nas suas características morfofisiológicas. As bactérias foram crescidas em meio YM líquido durante 3 dias a 28° C e posteriormente procedeu-se a extração do material genético pelo método MARMUR (1961) modificado.

Para isso, 1,5 mL da cultura foi transferido para frasco eppendorff e centrifugado a 10.000 rpm durante 3 minutos. Descartado o sobrenadante e ressuspensas as bactérias em 0,60 mL de solução FTA. Adicionado 60 µL de SDS 20%, misturado com leve agitação e incubado a 60°C durante 10 minutos. Deixado resfriar à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de fenol-clorofórmio e agitado vigorosamente em vórtex, após, centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. Foi transferido 500 µl da fase aquosa (superior) com micropipeta para outro tubo, ao qual foi adicionado 10 µL de NaCl 5 M e precipitado os ácidos nucléicos com 2 volumes de etanol. A solução resultante foi centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos e descartado o sobrenadante, em seguida foi lavado o precipitado de ácidos nucléicos com 300µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente foi descartado o sobrenadante e o material genético extraído foi dissolvido em 0,2 mL de tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) e adicionado 2µL da enzima RNase e posteriormente estocado no freezer a -20°C para a corrida em gel e futuras análises.

2.8 TÉCNICAS MOLECULARES (RAPD-PCR; ERIC-PCR; RFLP)

O material genético extraído foi submetido às análises de amplificação por polimorfismo de DNA amplificado por acaso (RAPD), amplificação de PCR com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam sequências repetidas (ERIC) e pela técnica de polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP).

Na análise por DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), foram determinados os perfis de RAPD dos isolados selecionados de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferos das espécies de leguminosas arbóreas

selecionas. A mistura de PCR continha água mili-Q ultrapura, 2 mM de MgCl₂, dNTP 0,25 mM, 2,5 U de polimerase de Taq (Invitrogen), tampão de PCR (Invitrogen), 50 pmol de iniciador e molde de DNA (BARATTO; et al, 2012).

Quatro oligonucleotídeos diferentes foram testadas em uma pequena amostra de isolados, a fim de selecionar o melhor iniciador para o estudo. Os oligonucleotídeos utilizados foram: P1254 (CCGCAGCCAA), OPB-17 (AGGGAACGAG), OPA-4 (AATCGGGCTG) e OPB-15 (CCAGGGTGTT). A amplificação foi realizada utilizando o seguinte programa: 4 ciclos de 94 ° C durante 4 minutos, 37 ° C durante 4 minutos e 72 ° C durante 4 minutos; depois 35 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 37 ° C durante 1 minuto, e 72 ° C durante 2 minutos, seguido por um 10 minutos final a 72 ° C. Os produtos de PCR (10 uL) de cada amostra foram carregadas em gel de agarose 1,0% e sujeito a eletroforese durante 2 horas a 3 VCM⁻¹. O gel foi observado sob luz ultravioleta e uma imagem digital foi capturada (Foto Capt Software versão 12.5 para Windows - Vilber Lourmat) para análise. Definiu-se o uso do iniciador OPA-4 (AATCGGGCTG) para a análise de todas as amostras, pois foi o que demonstrou maior polimorfismo nas amostras testadas (BARATTO; et al, 2012).

Para a amplificação de ERIC, a mistura de reação continha água mili-Q ultrapura, 2 mM de MgCl₂, dNTP 0,25 mM, 2,5 U de polimerase de Taq (Invitrogen), tampão de PCR (Invitrogen), 50 pmol de iniciador e molde de DNA. Os iniciadores utilizados foram: -1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e 2R (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'). O gel de imagem digital e foram produzidos tal como descrito anteriormente (BARATTO; et al, 2012).

Na técnica de polimorfismo pelo tamanho do fragmento de restrição (RFLP), primeiramente o material genético proveniente da extração foi submetido à amplificação da região RNAr 16S por PCR, que foi realizada usando uma mistura de

23 μL (10X tampão de PCR com MgCl_2 1,5 mM, dNTP 0,25 mM, 2,5 U de polimerase de Taq (Invitrogen), 50 pmol de cada iniciador e molde de DNA) e os iniciadores universais FD1: (5'-AGAGTTTGATCCTGGGTCAG-3') e RP2 (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (WEISBURG et al., 1991). As amostras foram submetidas ao seguinte programa: 35 ciclos de 94 ° C (1 min), 50 ° C (1 min) e 72 ° C (1 min e 30 s) em termociclador PCR modelo HBSP02110 (Thermo Electron Corp.).

Para a seleção da endonuclease de restrição a ser usada nos isolados obtidos, foi realizada a corrida *in silico* pelo método descrito por BERNARDI (2012) com o uso das endonucleases *Hinf I*, *Alu I*, *Taq I*, *Rsa I* e *Hae III*, e com o auxílio do programa de bioinformática Vector NTI Version 4.0; Para isso, sequências do gene ribossomal 16S de espécies dos gêneros *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus* e *Bradhyrhizobium* foram pesquisadas no GenBank (anexo 4); e armazenadas na memória do programa de bioinformática, procedendo assim a clivagem *in silico* com as endonucleases selecionadas, obtendo um padrão de restrição para cada um dos gêneros com suas respectivas espécies (anexo 1, 2 e 3). Com base na corrida *in silico*, foi selecionada a endonuclease *HinfI* para proceder os testes com os isolados.

Foram digeridos 14 μL do produto de amplificação de cada isolado obtido com endonucleases de restrição. Foram adicionadas 10 unidades de *Hinf I* (Invitrogen) a cada reação. Esta mistura foi incubada a 37 ° C durante 7 h. Os fragmentos de restrição foram separados por electroforese em gel de agarose a 2% com 0,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de brometo de etídio no tanque de electroforese, utilizando tampão TBE 0,5 x 2 a VCM^{-1} durante 5 h. Um marcador de peso molecular de DNA, escada de DNA de 100 pb (Ludwig Biotec), foi usada como padrão. O gel foi observado sob luz ultravioleta e uma imagem digital foi

capturada (Foto Capt Software versão 12.5 para Windows – Vilber Lourmat) para análise.

Para a análise estatística foram utilizados os programas Free Tree – prerelease version (version 0.9.1.50) para calcular o índice de similaridade de Jaccard com o método UPGMA entre os isolados com base nas análises genéticas e o programa TreeViem (Win32) version 1.6.6 para expressar os dados em dendrogramas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) é o principal bioma da serra catarinense, mas foi alvo de intensa exploração madeireira e uma grande mudança no uso do solo foi configurada (PRIMIERY et al., 2013). O bioma FOM ocupa aproximadamente 1.194 hectares, possuindo em sua composição as famílias *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Fabaceae*, *Flacourtiaceae*, *Asteraceae*, *Aquifoliaceae* e *Sapindaceae* com maior riqueza, que representa cerca de 52,8% do número total de espécies encontradas (HERRERA et al., 2009).

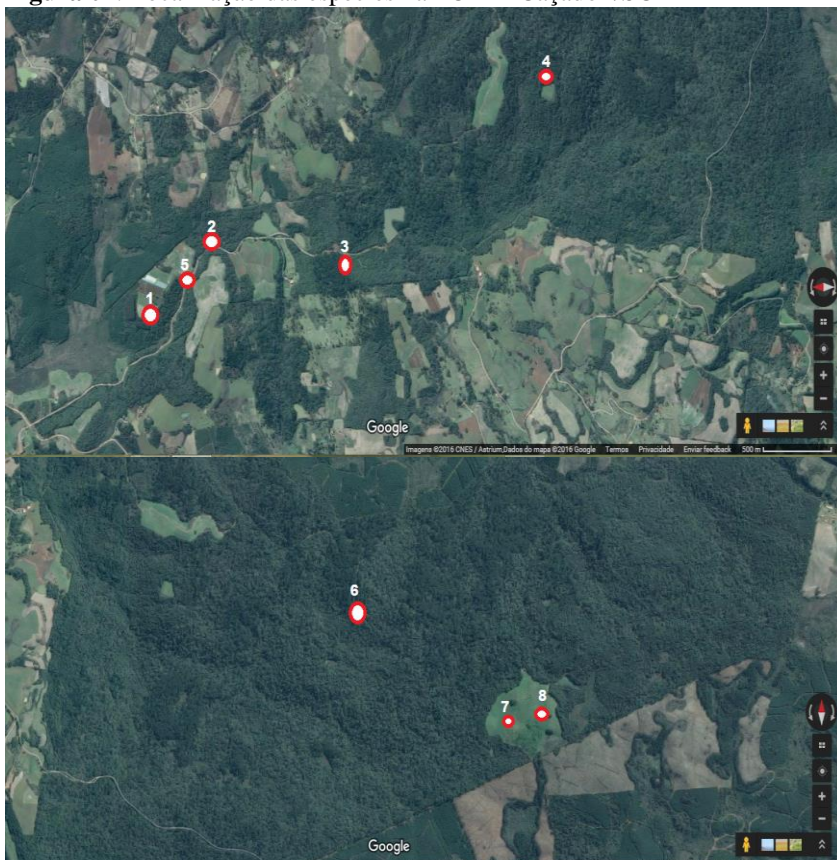
As espécies pertencentes à família *Fabaceae* possuem grande importância econômica, como: fixação de nitrogênio, madeira, forragem, adubação verde, celulose e papel, lenha, dentre outras utilidades. A simbiose realizada com bactérias fixadoras de nitrogênio as tornam importantes componentes para os sistemas naturais e agroflorestais.

De acordo com MOREIRA (1994), a família *Leguminosae* (*Fabaceae*), representa uma parcela significativa na composição florística de vários ecossistemas naturais. Grande parte das espécies pertencentes a essa família podem ser utilizadas para reflorestamentos, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável em função da crescente demanda mundial por celulose, papel, lenha, carvão e madeira, assim como também contribuem para a recuperação de áreas degradadas devido a sua simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Das sete espécies selecionadas, algumas são consideradas espécies pioneiras e outras ocorrem em áreas de floresta secundária ou em regeneração, e todas agregam importância econômica ao Brasil.

Entre as sete espécies estudadas, pode-se observar uma maior distribuição de *Mimosa scabrella* (natural) e de *Bauhinia forficata*, sendo que foram vistas em quase todas as áreas da

floresta. As demais espécies foram encontradas em regiões específicas (figura 1).

Figura 01. Localização das espécies na FOM – Caçador /SC



Fonte: GOOGLE MAPS (2015).

Legenda: **1** - *Machaerium brasilienses*; **2** - *Machaerium stipitatum* (Farinha seca); **3** - *Inga lentiscifolia* (Ingá); **4** - *Inga* sp (Ingá.); **5** - *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca); **6** - *Mimosa scabrella* (Bracatinga natural); **7** - *Mimosa scabrella* (Bracatinga de plantio); **8** - *Mimosa flocculosa* (Bracatinga de campo mourão).

O *Inga lentiscifolia* teve maior ocorrência em locais com mata mais fechada e maior teor de umidade, e *Inga* sp foi

encontrado em locais fechados também, porém sem um alto teor de umidade.

Machaerium brasilienses estava localizada em uma região mais seca e com a presença de muitas pedras e serapilheira. Já *Machaerium stipitatum* também foi encontrada em regiões de mata mais fechada e com alta umidade no solo.

Mimosa flocculosa está inserida na floresta via plantio em uma área delimitada, nessa área há presença de *Mimosa scabrella*, que também está inserida via plantio. Na figura 02 pode-se observar as exsicatas das leguminosas estudadas.

Figura 02. Exsicatas das leguminosas selecionadas para o estudo.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: **A** – *Mimosa scabrella* (Bracatinga natural); **B** – *Mimosa flocculosa* (Bracatinga de campo mourão); **C** – *Mimosa scabrella* (Bracatinga de plantio); **D** – *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca); **E** – *Inga lentiscifolia* (Ingá); **F** – *Inga* sp (Ingá); **G** – *Machaerium stipitatum* (Farinha seca, sapuva); **H** – *Machaerium brasilienses* (pau-sangue);

A Floresta Ombrófila Mista situada em Caçador/SC possui solos classificados como Nitossolo Bruno, compreendendo a solos minerais, não hidromórficos, com horizonte B textural, argila de atividade baixa, com fertilidade variável e baixa disponibilidade de fósforo. Estes solos ocorrem na Unidade de Relevo Planalto das Araucárias, normalmente em relevo ondulado e forte ondulado, sob vegetação de Savana e Floresta Ombrófila Mista. É caracterizado por invernos com geadas e verões com uma temperatura média de 22°C (CALDATO; LONGHI; FLOSS, 1999).

Tabela 02. Média das características químicas das amostras de solo coletadas em cada “planta”.

Parâmetros	Planta	<i>Ingá sp</i>	<i>Ingá lentiscifolia</i>	<i>Machaerium brasilienses</i>	<i>Machaerium stipitatum</i>	<i>Mimosa flocculosa</i>	<i>Mimosa Scabrella (Plantio)</i>	<i>Mimosa scabrella (natural)</i>	<i>Bauhinia forficata</i>
	pH		4.00	4.30	6.00	5.06	4.90	4.90	4.32
Índice de SMP		4.40	5.30	6.32	5.84	5.48	5.48	5.00	x
cmolc/d m ³	Ca	1.58	4.85	15.53	5.67	7.23	7.23	3.88	x
	Mg	1.34	2.04	3.68	2.34	2.13	2.13	2.43	x
	Al	4.09	2.08	0.01	0.36	0.60	0.60	2.06	x
	H+Al	27.78	10.78	3.15	5.76	8.02	8.02	15.12	x
	CTC	7.19	9.21	20.13	8.70	10.14	10.14	9.32	x
%	Alumínio	58.38	25.70	0.06	5.39	6.45	6.45	24.00	x
	Bases	10.24	41.05	86.12	48.49	54.13	54.13	35.11	x
	M.O	4.90	6.46	12.90	4.40	6.12	6.12	5.70	x
	C.O	2.84	3.75	7.48	2.55	3.55	3.55	3.31	x
	Argila	74.80	47.40	36.83	45.80	70.33	70.33	61.40	x
mg/dm ³	P	1.66	3.12	8.60	7.48	3.43	3.43	3.58	x
	S	x	x	x	x	x	x	x	x
	Na	10.00	7.20	14.16	24.40	6.67	6.67	10.40	x
	K	68.40	95.00	356.16	125.00	67.17	67.17	368.20	x
cmolc/ dm ³	CTC pH 7,0	30.88	17.92	23.26	14.09	17.55	17.55	22.38	x

Fonte: MARCHETTI (2015).

De acordo com a tabela 02, pode-se verificar que os solos coletados ao redor da raiz das leguminosas estudadas

possuem características ácidas, exceto o encontrado na espécie de *Machaerium brasilienses* que apresentou solo com característica próxima de neutra. Este solo ainda apresentou índices maiores de SMP, cálcio, magnésio, CTC, bases, matéria orgânica, carbono orgânico e fósforo no solo quando comparado com os demais, salienta-se que o local onde esta espécie foi encontrada possui a poucos metros de sua localização, áreas de plantio de milho. O solo coletado da espécie de *Inga* sp apresentou valores maiores para alumínio, argila e CTC em pH 7,0 comparando aos demais. Foram encontrados valores maiores de sódio no solo da espécie *Machaerium stipitatum* e maior valor de potássio no solo de *Mimosa scabrella* de ocorrência natural. Na espécie *Bauhinia forficata* não foram feitas coletas de solo para a caracterização devido a não formação de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes.

3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

3.1.1 Nódulos

A relação dos nódulos ocorrentes nas espécies estudadas está descrita na tabela 03. Todas as espécies apresentaram os dois tipos de nódulos pelo menos em uma das estações.

Tabela 03. Tipos de nódulos encontrados nas espécies durante o período de inverno e verão.

Espécie	Inverno	Verão
<i>Mimosa scabrella</i> (natural)	D e ND	ND
<i>Mimosa scabrella</i> (plantio)	ND	D e ND
<i>Mimosa flocculosa</i>	D e ND	ND
<i>Inga</i> sp	D	D e ND
<i>Inga lentiscifolia</i>	D e ND	ND
<i>Machaerium brasilienses</i>	D e ND	D e ND

<i>Machaerium stipitatum</i>	D	D
<i>Bauhinia forficata</i>	Sem nódulos	Sem nódulos

Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: D – determinado (esférico); ND – não determinado (cilíndrico/ramificado).

De acordo com MOREIRA (1994), os nódulos não determinados (ramificados) ocorrem nas três subfamílias de leguminosas, enquanto os determinados (esféricos/não ramificados) ocorrem predominantemente na subfamília *Papilionoideae*, assim como também correlaciona um maior tempo de atividade aos nódulos que se ramificam. Já os tipos de nódulos que não se ramificam são efêmeros como seu tecido fixador.

Pode ser verificado que ocorreu uma predominância de nódulos não determinados nas duas espécies pertencentes a subfamília *Papilionoideae* (*Machaerium brasilienses* e *Machaerium stipitatum*), assim como ocorreu a presença deste tipo de nódulos nas demais espécies, as quais pertencem às subfamílias *Mimosoideae*, correspondente às espécies *Mimosa scabrella*, *Mimosa flocculosa*, *Ingá sp* e *Ingá lentiscifolia*. Os nódulos podem ser visualizados nas figuras 03 e 04.

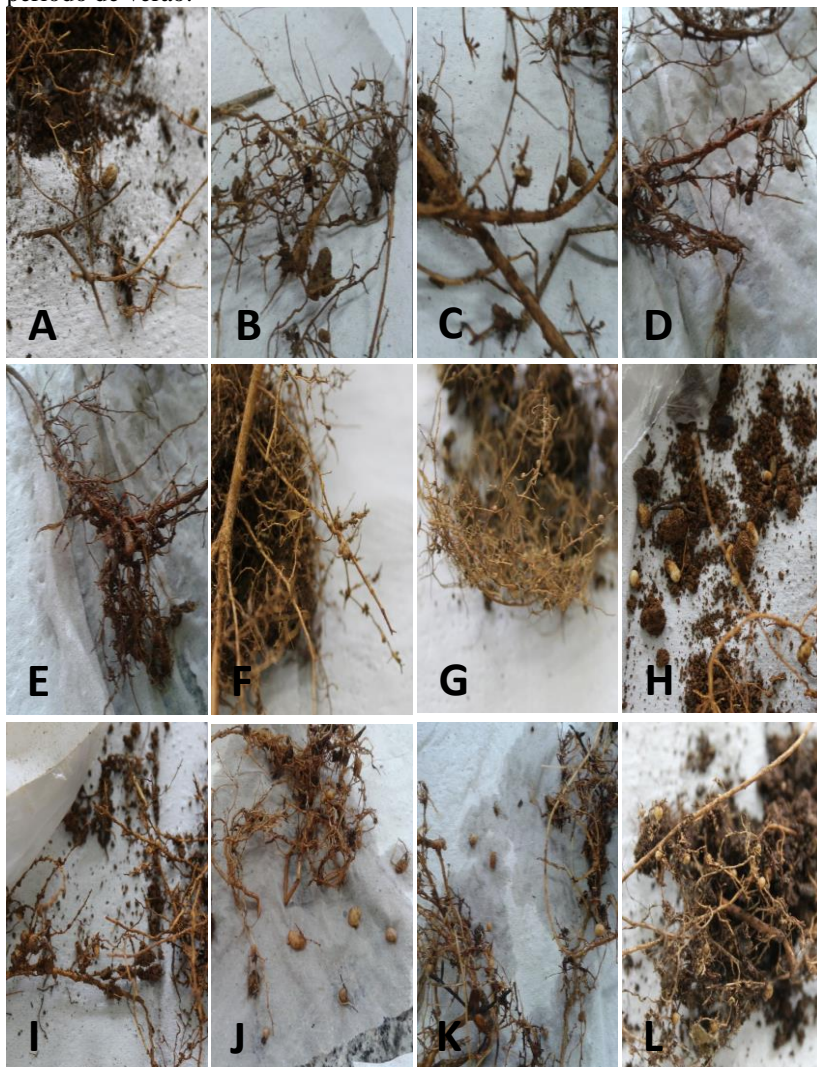
Figura 03. Nódulos encontrados em cada uma das espécies durante o período de inverno.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: A – *Inga lentiscifolia*; B e C – *Mimosa scabrella* (natural); D e E – *Mimosa flocculosa*; F e G – *Mimosa scabrella* (plantio); H e I – *Inga* sp; J e K – *Machaerium brasilienses*; L – *Machaerium stipitatum*;

Figura 04. Nódulos encontrados em cada uma das espécies durante o período de verão.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: **A** – *Inga lentiscifolia*; **B** e **C** – *Mimosa scabrella* (natural); **D** e **E** – *Mimosa flocculosa*; **F** e **G** – *Mimosa scabrella* (plantio); **H** e **I** – *Inga* sp.; **J** e **K** – *Machaerium brasilienses*; **L** – *Machaerium stipitatum*;

3.1.2 Caracterização dos Isolados Encontrados

Os isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio, foram separados em dois grupos, de acordo com o período de isolamento (inverno e verão). Tais grupos foram agrupados com base nas características morfofisiológicas, obtendo-se assim, 39 isolados durante a coleta de inverno e 40 na coleta de verão, totalizando 79 isolados, os quais estão descritos em mais detalhes na tabela 04.

Tabela 04: Número de isolados por planta durante as estações de inverno e verão.

Planta	Nº de isolados inverno	Nº de isolados verão
<i>Mimosa scabrella (natural)</i>	09	09
<i>Mimosa scabrella (plantio)</i>	04	03
<i>Mimosa flocculosa</i>	05	09
<i>Ingá sp.</i>	08	02
<i>Ingá lentiscifolia</i>	02	07
<i>Machaerium brasilienses</i>	04	04
<i>Machaerium stipitatum</i>	07	06
<i>Bauhinia forficata</i>	00	00
Total	39	40

Fonte: MARCHETTI (2015)

Conforme pode ser visualizado na tabela 04, o maior número de isolados foi na *Mimosa scabrella* de ocorrência natural com um total de nove isolados no verão e nove no inverno. A espécie *Ingá sp* obteve um maior número de isolados durante o inverno, ao contrário das demais que obtiveram mais isolados durante o período de verão.

Observou-se que apenas na leguminosa *Bauhinia forficata* não foi constatado a presença de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio. BARBERI et al. (1998) em trabalho sobre nodulação em leguminosas florestais também não verificou a ocorrência de nodulação nas espécies de *Bauhinia sp.* relatando ainda a baixa ocorrência de nodulação em

espécies da família *Caesalpinioideae*, a qual a *Bauhinia sp* pertence. De acordo com MOREIRA & SIQUEIRA (2006), a maioria das espécies de leguminosas não nodulíferas se encontram na família *Caesalpinioideae*.

Como pode ser observado o maior número de isolados foi encontrado em *Mimosa scabrella* (natural) que estava estabelecida em local com pH 4,32 e um dos valores mais altos de alumínio (tabela 02); as demais espécies também apresentaram situação semelhante. A única espécie que apresentou uma condição diferente em relação ao pH, foi *Machaerium brasilienses* que estava em solo com pH 6,0 e teor de alumínio extremamente baixo, sendo que este teve um número menor de isolados.

A acidez e toxicidade de alumínio são fatores comumente associados aos solos tropicais, e podem afetar as simbioses de leguminosas, porém nas simbioses de rizóbio com leguminosas arbóreas foi observada uma alta frequência de estirpes de rizóbio tolerantes a pH ácido. Uma maior frequência de estirpes tolerantes à acidez (pH 4,5) é encontrado em *Caesalpinioideae* com 85,7%, em segundo está as *Mimosoideae* apresentando 48,8% de estirpes tolerantes e menor frequência nas *Papilionoideae* com 28,8% (MOREIRA, 1994).

DOBEREINER (1984) relata que as espécies de leguminosas arbóreas são encontradas com nodulações abundantes apenas onde o equilíbrio foi perturbado ou em florestas de regeneração.

Com base nas características morfofisiológicas das bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes (tabela 05) das espécies de leguminosas arbóreas descritas por MOREIRA; HUISING; BIGNELL (2010) procedeu-se uma separação dos possíveis gêneros encontrados nos 79 isolados das espécies de leguminosas arbóreas selecionadas para o estudo.

Tabela 05. Agrupamento dos isolados obtidos, baseado nas características morfofisiológicas descritas por MOREIRA; HUISING; BIGNELL (2010).

Gênero Planta	<i>Allorhizobium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Sinorrhizobium</i> <i>Mezorhizobium</i>	<i>Bradryrhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i> <i>Cupriavidus</i>	<i>Burkholderia</i>	Não se encaixaram em nenhum grupo. 1< e ácido
<i>Mimosa scabrella</i> (natural)	01 (bi31) 45 (bv82)		05 (bi35) 42 (bv79) 44 (bv81)	50 (bv87)	02 (bi32) 03 (bi33) 07 (bi37) 43 (bv80) 46 (bv83) 47 (bv84) 48 (bv85) 78 (bi29)	04 (bi34) 06 (bi36) 79 (bi30) 49 (bv86)
<i>Mimosa scabrella</i> (plantio)	34 (bpv 68) 74 (bpi24)		72 (bpi22)		33 (bpv67) 35 (bpv69) 73 (bpi23) 75 (bpi25)	
<i>Mimosa flocculosa</i> (plantio)	26 (bcv60) 27 (bcv61) 28 (bcv62) 30 (bcv64) 70 (bci17)	31 (bcv65)	68 (bci15)		24 (bcv58) 25 (bcv59) 29 (bcv63) 32 (bcv66) 67 (bci13) 69 (bci16) 71 (bci19)	
<i>Ingá sp</i>	09 (ci39) 13 (ci45)	08 (ci38) 10 (ci40) 52 (cv89)	54 (ci41)		11 (ci43) 12 (ci44) 51 (cv88) 55 (ci42)	
<i>Ingá lentiscifolia</i>	38 (av73) 53 (av70) 76 (ai27)	39 (av74)	40 (av75)		36 (av71) 37 (av72) 41 (av76) 77 (ai28)	
<i>Machaerium brasilienses</i>	64 (ii10)	20 (iv52) 21 (iv53) 23 (iv57) 63 (ii09) 66 (ii12)		22 (iv55)	65 (ii11)	
<i>Machaerium stiptatum</i>	15 (xv47) 19 (xv51) 57 (xi02) 61 (xi07)	16 (xv48) 56 (xi01)	17 (xv49) 59 (xi04)	18 (xv50) 58 (xi03)	62 (xi08)	14 (xv46) 60 (xi05)

Fonte: MARCHETTI (2015).

Nota: os microrganismos foram caracterizados como *Burkholderia* por apresentarem alcalinização do meio de cultura, não podendo ser descartado ainda a existência de *Burkholderia* naqueles que apresentaram acidificação do meio de cultura, devido a sua versatilidade em relação a essa característica, porém estes foram agrupados em *Rhizobium*.

Como pode se observar na tabela 05, grande parte dos isolados agregam-se nas características relacionadas ao gênero *Burkholderia*, totalizando 29 isolados, seguido de 19 isolados pertencentes aos gêneros de crescimento rápido *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* aos quais não foi possível obter a separação, baseando-se somente nas características morfofisiológicas que foram correlacionadas, pois possuem as mesmas características.

O gênero *Bradhyrhizobium* ficou constituído de 12 isolados, logo em seguida obteve-se 11 isolados do gênero *Azorhizobium*, 04 isolados dos quais possuem características referentes ao gênero *Azorhizobium e Cupriavidus*, onde não foi possível obter a diferenciação dos mesmos com base na taxa de crescimento. E por último 06 isolados não se agruparam nas características dos gêneros relatados por divergências entre o tamanho da colônia e o pH observado no meio de cultura.

Verifica-se por meio do agrupamento, que a nodulação mais frequente nas espécies de *Mimosa* ocorreu pelas bactérias do gênero *Burkholderia*, seguida dos gêneros de crescimento rápido *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*. Constatou-se também a ocorrência do gênero *Azorhizobium* nas três espécies de *Mimosa*, um isolado com características de *Bradhyrhizobium* na espécie *Mimosa flocculosa*. Em *Mimosa scabrella* de ocorrência natural, constatou-se a presença de um *Azorhizobium/Cupriavidus* e de 04 isolados que não se encaixaram nas características para os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio relacionados.

De acordo com MOREIRA (2008), as principais espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes em espécies do gênero *Mimosa* são *Bradyrhizobium spp*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium etli biovar mimosae*, *Burkholderia caribensis*, *Ralstonia taiwanensis*, sendo que na *Mimosa scabrella* há uma maior ocorrência de *Burkholderia mimosarium* e na *Mimosa flocculosa* a maior ocorrência é de

Burkholderia sp. Mudando assim os estudos que indicavam como melhor simbiote espécies do gênero *Rhizobium*.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em sua instrução normativa nº 13/2011, consta apenas a recomendação para a espécie *Mimosa bimucronata*, indicando *Bradhyrhizobium* sp como inoculante.

De acordo com FARIA; UCHÔAS (2007), em seus estudos sobre inoculantes eficientes na FBN, as recomendações para *Mimosa scabrella* se remetem as espécies *Rhizobium* sp, *Bradyrhizobium* sp e *Burkholderia mimosarum* e para *Mimosa flocculosa* *Rhizobium* sp, *Bradyrhizobium* spp.

Segundo ROCHA (2007), recentemente foram descobertas espécies de β -proteobactérias que formam nódulos funcionais em leguminosas tropicais, sendo que a família *Burkholderiaceae* pertence a estas β -proteobactérias e incluem estirpes de *Burkholderia* (originalmente isoladas de *Machaerium lunatum*) e uma estirpe de *Ralstonia taiwanensis* (isolada de *Mimosa pudica*), fato este que confirma a versatilidade de espécies de *Mimosa*, em formar simbioses com vários gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Na espécie *Inga* sp foram encontrados quatro isolados característicos de *Burkholderia*, três de *Bradhyrhizobium*, dois com características para o grupo de crescimento rápido, agregando *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorrhizobium*, *Mezorhizobium* e um isolado possuindo aspectos de *Azorhizobium*. Na espécie *Inga lentiscifolia* a predominância foi do grupo de crescimento rápido e de *Burkholderia*, apresentando ainda um isolado correspondente a *Bradhyrhizobium* e um pertencente a *Azorhizobium*. Pode-se verificar que ambas apresentaram ocorrência dos mesmos simbioses, sendo que alguns com maior ocorrência em uma das espécies.

ALMEIDA et al. (2013), verificaram em seus estudos com cinco espécies de *Inga*, que 41,7% das estirpes acidificavam o meio de cultura, 33,3% alcalinizavam e 25%

mantinham neutro o pH do meio de cultura, 67,7% das colônias apresentou forma circular e 33,3% forma irregular, em relação ao tempo de crescimento, 58,3% foi lento, 33,3% intermediário e 8,3% rápido, a produção de muco variou de muito a abundante, cerca de 75% das colônias apresentou elevação plana com superfície lisa.

Os isolados encontrados neste estudo, 42,1% apresentaram crescimento rápido, com colônias maior que 1mm, de forma circular e alcalinizaram o meio de cultura, 31,6% possuíam crescimento intermediário a lento, colônias menores que 1mm de forma puntiforme e alcalinizaram o meio de cultura. E apenas 26,3% apresentaram crescimento rápido com colônias circulares maiores que 1 mm e acidificaram o meio de cultura. Assim, verifica-se que foram encontrados isolados com características semelhantes ao trabalho de ALMEIDA et al. (2013), porém em proporções diferentes.

SILVA (2010) estudando a diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas, entre estas, a autora selecionou várias espécies de *Inga*, sendo 100% dos isolados com crescimento rápido e a acidificação do meio de cultura, apresentando características para os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mersorhizobium*. Em seu estudo ainda pode-se observar que em relação aos índices de diversidade, as espécies de *Inga* variaram de 0,24 a 1,49 diante de índice de Shannon.

Conforme SANTOS (2010) em seu trabalho sobre a diversidade de bactérias em nódulos de *Inga vera*, constatou-se em sua primeira coleta, maior ocorrência de colônias de crescimento rápido com coloração amarela, brilhante, com bordas inteiras, produção de muco, correspondendo a 61% e uma menor parte correspondente a 23% das colônias com coloração branca, crescimento lento, forma circular com bordas lisas e com a capacidade de alcalinizar o meio, produzindo pouco ou nenhum muco. Na segunda coleta a predominância foi de bactérias de crescimento rápido, e na terceira coleta, a

maioria das bactérias isoladas dos nódulos apresentou crescimento lento.

Vários gêneros de leguminosas arbóreas das três subfamílias podem ser nodulados por estirpes de crescimento rápido e de crescimento lento e entre estes, o gênero *Inga* está inserido (MOREIRA, 1994).

Nas espécies do gênero *Inga* também prevaleceram os nodulantes do gênero *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, com ocorrência dos gêneros *Bradhyrhizobium* e *Azorhizobium*. Nas espécies de *Inga*, de acordo com MOREIRA (2008) temos como principal simbionte *Bradyrhizobium japonicum*.

De acordo com FARIA; UCHÔAS (2007), em seus estudos sobre inoculantes eficientes na FBN, as recomendações para *Inga marginata* se remetem a *Bradyrhizobium sp*, para a espécie de *Inga thibaudiana* recomenda-se *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium sp*.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em sua instrução normativa nº 13/2011, consta a recomendação para a espécie *Inga marginata*, *Bradyrhizobium elkanii* como inoculante.

Dos isolados constituintes das espécies de *Machaerium*, 57,2% apresentaram crescimento lento a intermediário, com colônias puntiformes menores que 1mm, pouca produção de muco e alcalinizando o meio de cultura, características estas que se remetem aos gêneros *Bradhyrhizobium*, *Azorhizobium* ou *Cupriavidus*; 23,8% das colônias apresentaram-se circulares maiores que 1mm, com crescimento rápido média a muita produção de muco e acidificando o meio de cultura, o que se remetem a espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Mesorhizobium*; 9,5% dos isolados obtidos apresentaram características para o gênero *Burkholderia*, sendo colônias circulares maiores que 1mm, com média a muita produção de muco, crescimento rápido e alcalinização do meio de cultura. Ocorreu ainda na espécie de *Machaerium stipitatum*

a presença 9,5% de isolados que diferenciaram suas características dos demais grupos, por apresentarem colônias menores que 1mm e acidificarem o meio de cultura.

BARBERI et al. (1998), estudando a nodulação em leguminosas florestais em viveiros de Minas Gerais, observaram a nodulação de estirpes com crescimento lento, colônias menores que 1mm com colorações brancas de pouca a média produção de muco e que alcalinizavam o meio de cultura, se remetendo assim a espécies do gênero *Bradhyrhizobium*. E estirpes com características de crescimento rápido com colônias de coloração branca com pouco produção de muco e alcalinizando o meio de cultura, correlacionaram-se a espécies do gênero *Burkholderia* em duas espécies do gênero *Machaerium*.

MOULIN et al. (2001) em seu trabalho sobre a nodulação em leguminosas por membros do grupo de β -proteobactérias, verificou que espécies do gênero *Burkholderia* são capazes de nodular espécies do gênero *Machaerium* e VANDAMME et al. (2002) relata que *Burkholderia phymatum* foi isolada de *Machaerium lunatum* na Guiana Francesa.

MOREIRA (2008) correlaciona a nodulação das espécies *Burkholderia sp*, *Bradhyrhizobium japonicum*, *Rhizobium tropici* e *Burkholderia plymotum* em espécies de *Machaerium*.

Com relação ao aparecimento de isolados com características divergentes das demais apresentadas para os oito gêneros descritos como nodulantes, CASTELARI (2010) relatou em seu trabalho sobre a diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica, que diversos gêneros não apresentam bactérias normalmente consideradas nodulíferas de leguminosas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, sendo possível que estas bactérias representem endofíticos de nódulos. Possivelmente esse é o caso daquelas espécies que apresentaram características morfofisiológicas

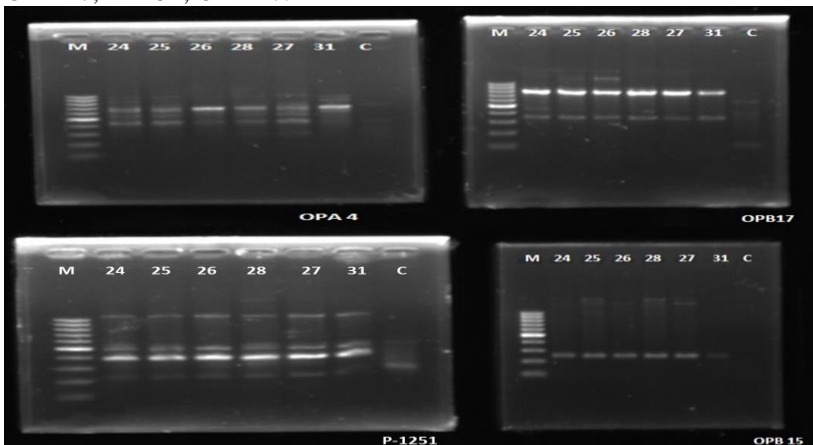
diferentes das que são encontradas nos gêneros descritos por MOREIRA; HUISING; BIGNELL (2010).

CHEN et al. (2001) também relataram sobre novos isolados de fixadores de nitrogênio em espécies de *Mimosa*, sendo que foram encontradas espécies de *Ralstonia taiwanensis* nodulando a espécie.

3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS

Com base na avaliação morfofisiológica dos isolados, avaliou-se o grau de polimorfismo obtido pelos grupos encontrados, fazendo uso das técnicas de RAPD e ERIC. Para a técnica de RAPD foram inicialmente feitos testes com uma parcela de isolados que apresentaram perfis correspondentes a três grupos de acordo com as características morfológicas, provenientes da espécie de leguminosa *Mimosa flocculosa*. Testaram-se oligonucleotídeos iniciadores diferentes a fim de obter o melhor iniciador para prosseguir os testes com as amostras dos isolados, o qual pode ser observado na figura 05.

Figura 05. Padrões de pares de base encontrados em isolados bacterianos de *Mimosa flocculosa* usando a técnica de RAPD com os primers OPA-4, OPB-17, P-1251, OPB-17.

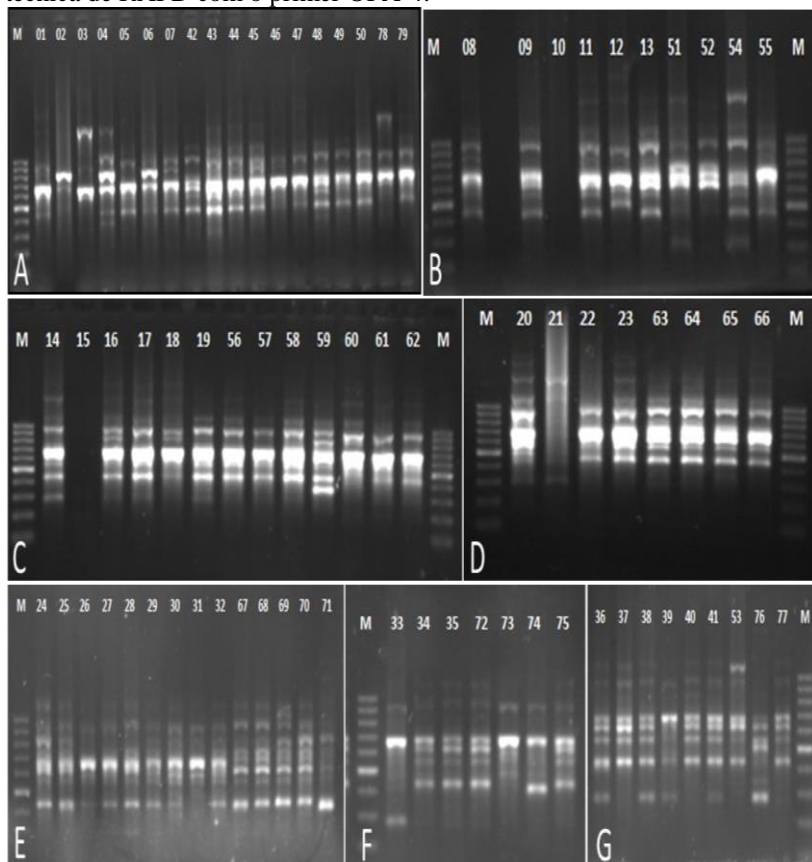


Fonte: MARCHETTI (2015).

Conforme pode ser visualizado na figura 05, o melhor grau de polimorfismo para as bactérias fixadoras de nitrogênio foi com o uso do primer OPA-4, seguido do primer P-1251. Com base nesta avaliação o teste com os demais isolados foi realizado com o uso de OPA-4.

As imagens dos géis obtidos posteriormente às ampliações com uso das técnicas de análise de polimorfismo ERIC e RAPD podem ser visualizadas nas figuras 06 e 07.

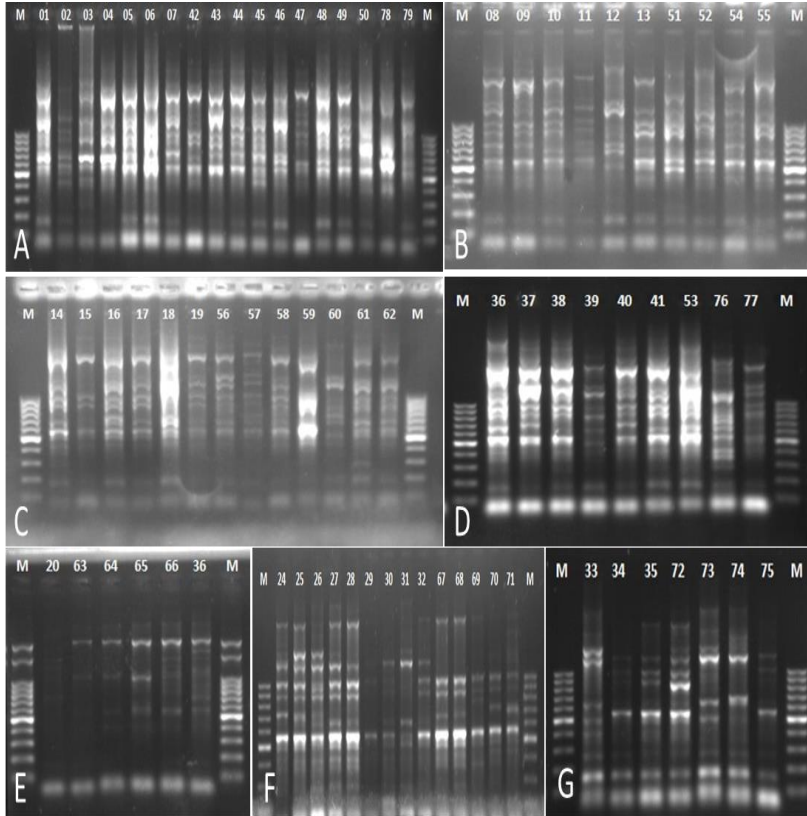
Figura 06. Padrões de banda encontrados nos isolados bacterianos usando a técnica de RAPD com o primer OPA-4.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: **A** – *Mimosa scabrella* (natural); **B** – *Inga* sp; **C** – *Machaerium stipitatum*; **D** – *Machaerium brasilienses*; **E** – *Mimosa flocculosa*; **F** – *Mimosa scabrella* (plantio); **G** – *Inga lentiscifolia*;

Figura 07. Padrões de bandas encontrados nos isolados bacterianos usando a técnica de ERIC



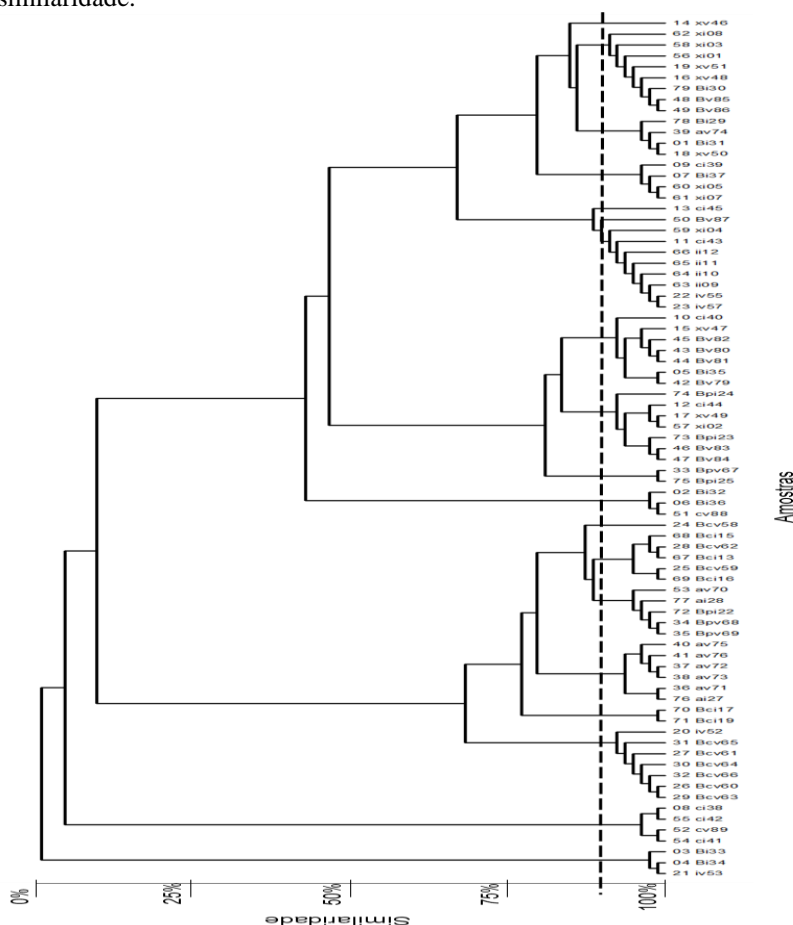
Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: **A** – *Mimosa scabrella* (natural); **B** – *Inga* sp; **C** – *Machaerium stipitatum*; **D** – *Machaerium brasilienses*; **E** – *Mimosa flocculosa*; **F** – *Mimosa scabrella* (plantio); **G** – *Inga lentiscifolia*;

Com relação aos pares de base apresentados diante do polimorfismo por RAPD, foi montado um dendrograma (figura 08) fundamentado no índice de similaridade de Jaccard, pelo

método UPGMA, o qual permitiu a formação de seis grupos com uma similaridade de 50%. Quando submetido ao corte de 90% de similaridade, obtém-se a presença de dezenove grupos. Dessa forma fica evidenciada a existência da diversidade entre as espécies, correlacionando seu grau de polimorfismo obtido pela amplificação no método RAPD.

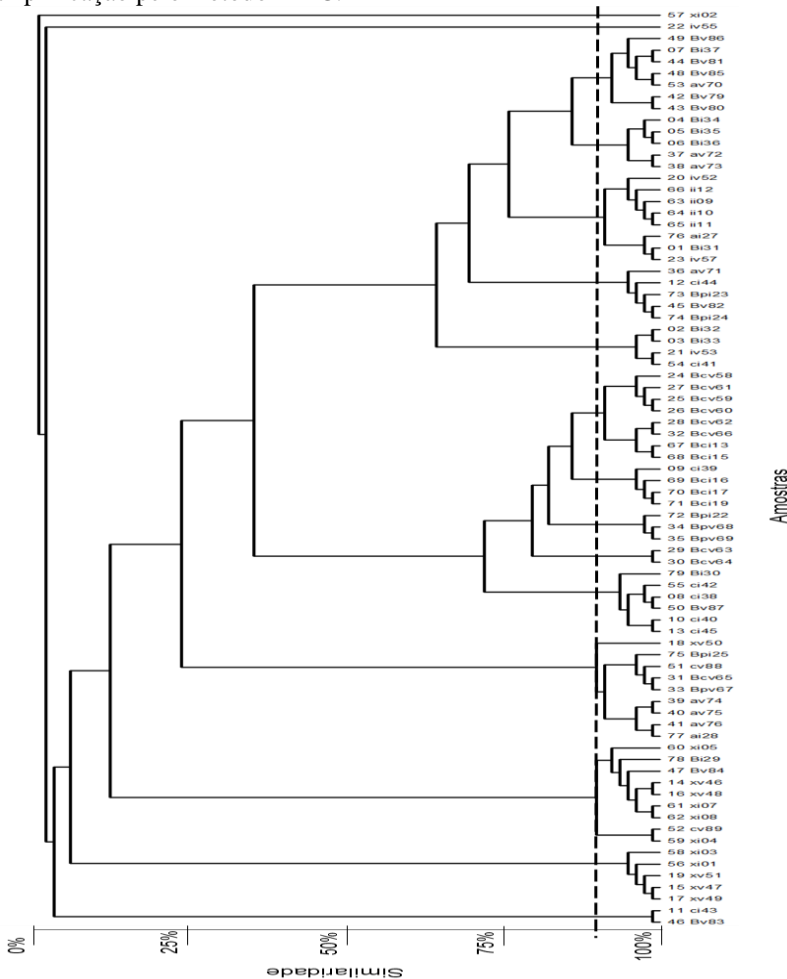
Figura 08. Dendrograma baseado nos pares de base obtidos na amplificação pelo método RAPD com o primer OPA-4; corte de 90% de similaridade.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Quando realizado o corte com base na similaridade de 50% entre os isolados, a técnica de ERIC apresentou oito grupos com perfis polimórficos similares, e submetendo a um corte baseado em 90% de similaridade é possível a observação de 18 grupos com a técnica de ERIC (figura 09).

Figura 09. Dendrograma baseado nos pares de base obtidos na amplificação pelo método ERIC.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Com um nível de 90% de similaridade a técnica de RAPD apresentou 19 grupos contra 18 grupos pela técnica de ERIC, demonstrando assim melhor separação entre os isolados do que com esse último. Considera-se ainda que ambas as técnicas foram eficientes quanto a agrupamento dos isolados de acordo com o grau de polimorfismo.

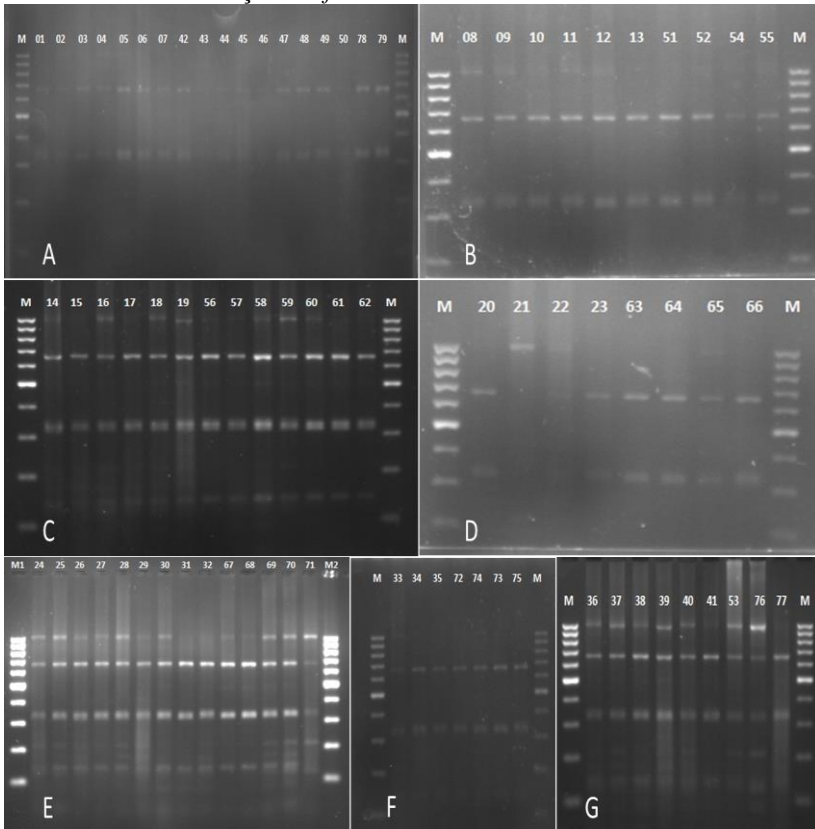
Para a diferenciação dos isolados pelo método RFLP, com base na corrida em sílico, foi selecionada a endonuclease *HinfI* para proceder os testes com os isolados, a qual obteve maiores diferenciações entre os gêneros (anexo 1, 2, 3 e 4).

Conforme os padrões de pares de bases obtidos, verifica-se que em todas as espécies de leguminosas arbóreas pesquisadas há a presença de bactérias do gênero *Burkholderia*, pois com o uso da endonuclease de restrição *HinfI* na corrida em sílico (anexo 3), foi possível observar a presença de um padrão de pares de base em ≈ 680 e outro em ≈ 320 , correspondente ao gênero *Burkholderia*, sendo que os demais gêneros não apresentaram padrões parecidos a este.

De acordo com YANG et al. (2006), novas estirpes de *Burkholderia* tendo sido isoladas de solo de floresta, e possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico; estas foram identificadas como *Burkholderia terrae*.

Isolados de *Mimosa scabrella* (natural), *Ingá sp*, *Machaerium brasilienses* e *Mimosa scabrella* (plantio), apresentaram apenas dois padrões de banda, sendo que nas demais espécies foi possível observar mais padrões. As bactérias isoladas dos nódulos de *Mimosa flocculosa* e *Ingá lentiscifolia*, obtiveram melhores resultados para a diferenciação, com a presença de mais pares de base provenientes da clivagem com *Hinf I*. Isso significa que há presença de diferentes espécies dentre este gênero nestas espécies (figura 10).

Figura 10. Padrões de banda encontrados nas espécies usando a endonuclease de restrição *HinfI*.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Legenda: **A** – *Mimosa scabrella* (natural); **B** – *Inga* sp; **C** – *Machaerium stipitatum*; **D** – *Machaerium brasiliense*; **E** – *Mimosa flocculosa*; **F** – *Mimosa scabrella* (plantio); **G** – *Inga lentiscifolia*;

Comparando-se aos resultados encontrados com a caracterização morfofisiológica, verifica-se algumas divergências nos resultados, pois quando foram analisados pelas características durante o isolamento, obteve-se indicação de vários gêneros de bactérias nas espécies de leguminosas arbóreas. A maior ocorrência de microrganismos presentes em

nódulos nas leguminosas selecionadas foi do gênero *Burkholderia*, porém com a endonuclease *HinfI*, não foi evidenciado a distinção dos demais grupos que estavam presentes nos nódulos. Isso é evidenciado pela comparação com as *Machaerium*, em que não se teve predominância deste gênero nodulando a espécie e sim, a predominância dos gêneros *Bradhyrhizobium* e *Rhizobium* pelas características morfofisiológicas (tabela 05).

Verifica-se que este gênero de bactéria tem se distribuído largamente entre as espécies de leguminosas, embora a pouco tempo não se tinham indícios de nodulação pelo gênero *Burkholderia*, hoje em dia são inúmeros os relatos, principalmente entre as espécies de *Mimosa*. Acredita-se que o uso de tecnologias mais precisas, tenham auxiliado para a identificação desses microrganismosfixadores de nitrogênio.

Conforme salientado durante a avaliação morfofisiológica, outra correlação a ser feita é a presença de microrganismos endofíticos nos nódulos de leguminosas arbóreas. SILVA (2010), trabalhando com a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, correlacionou a presença de endofíticos nos nódulos de leguminosas, como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*. LI et al. (2008), em seus estudos também relatam a ocorrência de bactérias endofíticas em nódulos de leguminosas, como dos gêneros *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter* e *Agrobacterium*.

EHRHARDT-BROCARDO et al. (2015), em estudos com isolados de nódulos de bracinga, constataram a presença isolados com similaridades de 97% a 99% com as espécies *Burkholderia unamae*, *B.nodosa*, *B. caledonica*, *B. phytofirmans*, *B. bryophila*. Ainda nesse trabalho, encontrou três isolados com 96% de similaridade ao gênero *Pantoea* e um isolado com 97% de similaridade ao gênero *Pseudomonas*, sendo esses endofíticos dos nódulos. Apenas um isolado teve 99% similaridade ao gênero *Rhizobium*.

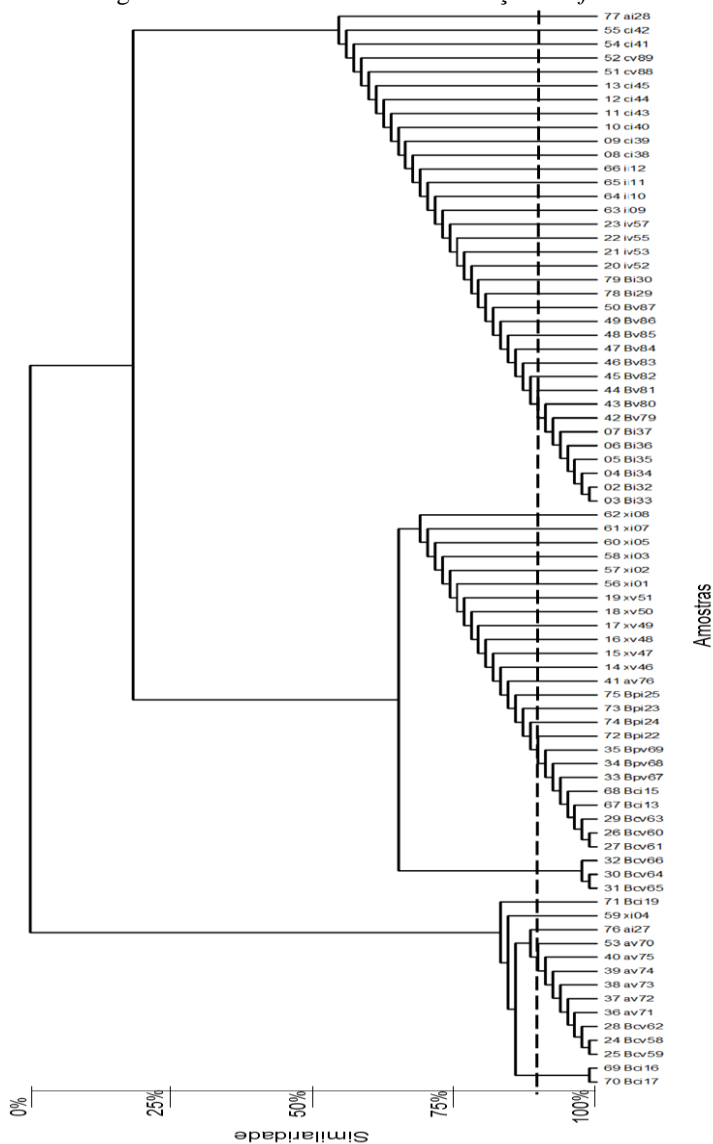
Com base no agrupamento pelo índice de similaridade de Jaccard, usando o método UPGMA, obteve-se três grupos com 50% de similaridade provenientes da endonuclease de restrição *HinfI*; com um índice de similaridade de 90%, foi possível observar a presença de 54 grupos. O dendrograma com os grupos pode ser visualizado na figura 11.

Conforme visualizado nos géis provenientes da endonuclease *HinfI* percebe-se a predominância de espécies do gênero *Burkholderia* e o dendrograma obtido pelo índice de similaridade de Jaccard, com um corte de 90% de similaridade, demonstrou uma alta diversidade de espécies dentro do gênero, comprovando assim o que se obteve quando observado o grau de polimorfismo pelas técnicas de RAPD e ERIC.

LARGUERRE et al. (2001) utilizaram a metodologia de RFLP para avaliar a diversidade de estirpes de rizóbio; as análises mostraram, de uma maneira geral, a correlação com o espectro hospedeiro e independência do status taxonômico, já que os resultados não foram concordantes com os baseados na sequência do 16S rDNA.

DI CELLO et al. (1997) utilizaram a metodologia de RAPD para estudar mudanças na estrutura de populações de *Burkholderia cepacia* ao longo do crescimento de plantas de milho. Os autores identificaram um alto grau de polimorfismo, ou seja, alta diversidade genética entre os isolados. LARGUERRE et al. (2001) ressaltam sobre a transferência lateral entre espécies de rizóbio, que desempenham importante papel na diversidade e na estrutura de suas populações naturais. Com esse entendimento, pode-se supor que a capacidade de transferência vinculada ao alto grau de polimorfismo garante alta versatilidade ao gênero *Burkholderia*. Autores têm sugerido que algumas bactérias endofíticas de nódulos poderão evoluir para bactérias simbióticas por meio da transferência horizontal de genes simbióticos (LI et al., 2008; SHIRAISHI et al., 2010).

Figura 11. Dendrograma com a endonuclease de restrição *Hinfi*.



Fonte: MARCHETTI (2015).

Nota: baseado nos pares de base obtidos pela clivagem e com corte de 90% de similaridade.

Algumas características do genoma dos microrganismos podem influenciar a grande versatilidade deles em responder ao meio, como por exemplo presença de replicons ou múltiplas sequências de inserção. De acordo com DINIS et al. (2008) na maioria das espécies de *Burkholderia* os genomas são grandes, o que lhes confere um dramático efeito sobre a estrutura cromossômica, o que talvez possa explicar a sua grande versatilidade.

SANTOS (2010) em estudo com bactérias de nódulos de *Inga vera*, constatou uma ampla diversidade genética dos formados não só por α -proteobactérias, principalmente espécies de *Bradyrhizobium*, mas também por β -proteobactérias identificadas como sendo *Burkholderia*, gênero pela primeira vez relatado como associado aos nódulos desta leguminosa arbórea.

LUVIZOTTO (2008), trabalhando com a caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* associadas a raízes de cana-de-açúcar, relatou sobre a existência de 2 a 3 cromossomos nas espécies pertencentes ao gênero, além da capacidade de multireplicação, o que confere uma ampla plasticidade genômica e adaptabilidade metabólica às espécies. Salienta ainda que este gênero pode colonizar a rizosfera e ambientes endofíticos de uma vasta gama de plantas.

Uma análise filogenética de *NodA* e análise dos genes simbióticos *nodC*, *nifH*, e *nifHD* nos estudos de SHIRAISHI et al. (2010), sobre a nodulação por α -proteobactérias e betaproteobactérias, detectaram a ocorrência de nodulação em *Robinia pseudoacacia* por *Pseudomonas* sp e a presença de genes simbióticos nesse gênero. Esses autores constataram, ainda, que o gene *NodA* apresentava alta relação genética entre estirpes de *Pseudomonas* sp, *Agrobacterium* sp, *Burkholderia* sp e *Mesorhizobium loti* isoladas do mesmo solo, o que indica uma possível ocorrência de transferência lateral de genes, indicando que as estirpes simbiotes adquiriram os genes de espécies rizobianas do solo.

LI et al. (2008) observaram semelhanças de 99% nos genes *nifH* de *Bradyrhizobium japonicum* e das estirpes de *Bacillus* endofíticos encontrados, o que indicaram fortemente que a transferência horizontal de genes simbióticos entre as bactérias simbióticas e os endófitos.

DINIZ et al. (2008), avaliando a genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*, considerou a transferência horizontal de genes como um mecanismo chave na evolução bacteriana, sendo que a transferência horizontal de genes pode ter um impacto mais imediato e significativo sobre o fenótipo do organismo quando comparado com processos mais lentos, tais como acúmulo de mutações no interior de genes individuais e a subsequente seleção por fenótipos vantajosos.

De acordo com MOREIRA (2010) o gênero *Burkholderia* possui alta diversidade, o que pode ser resultante da organização e do tamanho do seu genoma, já que o genoma de diferentes estirpes de *Burkholderia cepacia* possui de dois a quatro cromossomos de diferentes tamanhos e contém um grande número de sequências de inserção. Este número elevado de sequências de inserção pode ter um papel importante na habilidade desta bactéria de se adaptar a diferentes ambientes por meio de transferência genética e mutação.

O gênero *Burkholderia* possui alta versatilidade nutricional também, pois é capaz de crescer em mais de duzentos compostos orgânicos, dentre eles se encontram fontes de carbono incomuns como ácido azeláico e triptofano. Essa capacidade nutricional contribui para a habilidade competitiva frente a outros microrganismos em relação aos exsudados de plantas (LUVIZOTTO, 2008).

4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo, entendemos que são necessários os seguintes encaminhamentos:

- Sequenciamento dos isolados obtidos;
- Estudo sobre a caracterização dos nódulos ramificados e não ramificados;
- Confirmar a formação de nódulos pelos isolados nas respectivas espécies hospedeiras;

5 CONCLUSÃO

Considerando as condições de condução do estudo, entendemos que é possível concluir que:

No estudo analisado pela caracterização morfofisiológica, obteve-se a indicação de vários gêneros nodulando as espécies de leguminosas arbóreas encontradas, resultado este que não foi possível observar com a análise genética dos isolados, considerando assim que critérios com base nas características morfofisiológicas não foram tão eficazes para a caracterização dos gêneros. Critérios estes que não devem ser descartados para a caracterização de isolados, porém não são suficientes para a identificação de espécies.

A análise do polimorfismo genético dentre os isolados se mostrou eficaz com as duas técnicas usadas, sendo RAPD com o primer OPA-4 e ERIC, demonstrando um alto grau de polimorfismo. O uso da endonuclease de restrição *HinfI*, destinou para apenas um gênero de microrganismo nodulante das espécies de leguminosas arbóreas estudadas, ou seja, foi predominante a nodulação do gênero *Burkholderia*, a qual foi correlacionado quanto a sua versatilidade nutricional e adaptativa, caracterizando assim o elevado grau de polimorfismo existente dentro do gênero.

Considera-se que melhores resultados poderiam ser obtidos usando outros tipos de endonucleases de restrição.

Preocupa-se com a versatilidade existente no gênero *Burkholderia* em relação às interações ecológicas, já que a mesma, conforme demonstrado por outros autores, possui alta capacidade/habilidade de adaptação e transferência genética, considerando-se assim que o gênero poderia ter efeito ruim em relação aos demais gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio.

6 BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, Glória da Silva; et al. Capacidade de Nodulação em *Inga sp.* de Ocorrência na Amazônia Ocidental. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013.
- ARAÚJO, Ricardo S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, Mariangela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microrbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 1994.
- BARATTO, Cesar Milton; et al. Potential Use of Molecular-Typing Methods for the Identification and Characterization of Salmonella Enterica Serotypes Isolated in the Poultry Production Chain. **Brazilian Journal of Poultry Science**. Jul - Sept 2012/ v.14 / n.3 / 159-232.
- BARBERI, Alexandre; et. al. Nodulação em Leguminosas Florestais em Viveiros no Sul de Minas Gerais. **CERNE**, V.4, N.1, p.145-153, 1998.
- BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating Lupinus spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.1086-1091, 1997
- BERNARDI, Alini Zarpelon; **Lipases com Potencial Aplicação para Produção de Biodiesel: Microrganismos Produtores e Expressão Heteróloga**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Oeste de Santa Catarina. 2012.

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

CALDATO, Silvana Lucia; LONGHI, Solon Jonas; FLOSS, Paulo Afonso. Estrutura populacional de *Ocotea porosa* (*Lauraceae*) em uma Floresta Ombrófila Mista, em Caçador (SC). **Ciência Florestal**. Santa Maria, 1999. v.9, n.1, p. 89-101.

CASTELARI, Aline Souza. **Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. 98p. 2010.

CANOSA, Gabriela A.; FARIA, Sérgio Miana de; MORAES, Luiz Fernando Duarte de. **Formação de base de dados para a identificação do potencial de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas da Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro**. XI semana científica Johanna Döbereiner. Outubro, 2011.

CHEN, W. M; et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2001 Sep;51(Pt 5):1729-35.

DI CELLO, F; et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* Population Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Plant Growth Stages. **American Society for Microbiology**. p. 4485–4493 Vol. 63, No. 11. Nov. 1997.

DINIZ, M.C. et al. Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: Dois Patógenos de Primeira Grandeza e de Genomas Surpreendentemente Complexos.

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 2, n 1, p. 01 – 33, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DÔBEREINER, Jonanna. Nodulação e Fixação de Nitrogênio em Leguminosas Florestais. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 19 s/n: 83-90, jun. 1984.

EHRHARDT-BROCARDI, Natalia Carolina Moraes et al . Cultural, Morphological and Genetic Diversity of Diazotrophs Isolated from Nodules of Bracatinga. **Rev. Árvore**, Viçosa , v. 39, n. 5, p. 923-933, out. 2015 .

FAGAN, Evandro Binotto; et al. FISILOGIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA – REVISÃO. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p. 89-106. 2007.

FARIA, Sergio Miana de; UCHÔAS, Elisabeth da Silva. **Indicação de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de uso múltiplo, atualização ano base 2006**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia. 2007. 16p.

GASPER A. L. de; et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da Floresta Ombrófila Mista. **Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro – Rodriguésia**. v.64(2): 201-210. 2013

HERRERA, Hugo Alberto Hivera; et al. Análise Florística e Fitossociológica do Componente Arbóreo da Floresta Ombrófila Mista Presente na Reserva Florestal

Embrapa/Epagri, Caçador, Sc – Brasil. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 39, n. 3, p. 485-500, jul./set. 2009.

HUNGRIA, Mariangela. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, Mariangela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microrbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 1994.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

ISRAEL, D.W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, v.84, n.3, p.835-840, 1987.

JANCZAREK, Monika; et.al. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**. v85. 2014. Pag 94-113.

JARVIS, B.D.W.; DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.93-96, 1992.

KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.3, p.487-492, 1986

KURASZ, Gilberto; et. al. Levantamento Semidetalhado de Solos para Atualização de Legenda na Reserva Florestal Embrapa/Epagri de Caçador-SC. **III Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas Colombo**. Dezembro, 2004.

KURASZ, G. **Sistema de Informações Geográficas aplicado ao Zoneamento Ambiental da Reserva Florestal Embrapa/Epagri, Caçador-SC**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

KUZMA, M.M. et al. The Site of Oxygen Limitation in Soybean Nodules. **Plant Physiology**, February 1999, v.119, p.399–407.

LESSA, Ruth Néia Teixeira. **Ciclo do nitrogênio**. Setembro, 2007. Pelotas.

LARGUERRE, G; et al. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. **Microbiology**. 147, 981–993. 2001.

LI, J.H; et al. Genetics diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean growth in Heilongjiang province of China. **Soil Biology Biochemistry**. Oxford. v.40, n.1. p.238-246. Jan, 2008.

LOUREIRO, Maria de Fátima. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, Mariangela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microrbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 1994.

LUVIZOTTO, Danice Mazzer. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. Associadas às raízes de cana-de-açúcar.** Escola Superior Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2008.

MACHADO, Sebastião do Amaral; et al. Funções de distribuição diamétrica em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.39, n.8. p.2428-2434. Nov,2009.

MARMUR, Julius. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **J. Mol. Biol.** 3:208, 1961. Department of chemistry, Harvard University, Cambridge, MA.

MARIN, Victor Augustus; et. al. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. **Embrapa Agrobiologia - Documentos (INFOTECA-E)**. Julho, 2003. 24 p. Disponível em:<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf>

MAUNOURY, N; et al. Cell Biology of Nodule Infection and Development. In: DILWORTH, M.J. et al. **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses**. Cap. 6. Pág 153-189. Institut des Sciences du Végétal.

MEHTA, Angela; MEHTA, Yeshwant R; ROSATO, Yoko B. **Diversidade genética em *Drechslera avenae* e *Stemphylium solani* utilizando ERIC e REP – PCR.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. 16p. Brasília, 2003.

MEYER, Leila et al. Fitossociologia do componente arbóreo/arbustivo da Floresta Ombrófila Mista em Santa

Catarina. In: VIBRANS, Alexander Christian et al. **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina: Floresta Ombrófila Mista**. Blumenau: edifurb, 2013. v.3

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa nº13/2011**.

Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA_347_ADD_1.pdf.

MOULIN, L; et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**. Jun/2001. 21;411(6840):948-50.

MOREIRA, Fátima M. S. Fixação Biológica do Nitrogênio em Espécies Arbóreas. In: ARAÚJO, Ricardo S; HUNGRIA, Mariângela. **Microrganismos de importância agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão: Centro Nacional de Pesquisa de Soja. - Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 236p.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 2ª ed. 729p.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza. **Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae**. In: MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo; BRUSSAARD. Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: ed. UFLA, 2008.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo; BRUSSAARD. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: ed. UFLA, 2008.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza; et. al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. v.1(2): 74-99, 2010.

MOREIRA, Fatima M. S.; HUISING, E. Jeroen; BIGNELL, David E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010. 368p

NASCIMENTO, A. R. T.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de Floresta Ombrófila Mista em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n.1, p. 105-119, 2001.

OLIVEIRA, Arlem Nascimento de; FLOR, Nathália Siqueira; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**. v.40(2) 2010: 401-404.

OLIVEIRA, Marcia Cristina de Sena. Et. al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos, São Paulo. 2007.

PREMIERI, Silmar; et al. Diversidade morfológica de rizobactérias em nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina. **Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IFSC**. 2013.

PRIMAVESI, Ana. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 2002.

REIS JUNIOR, Fábio Bueno dos; Et. al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Embrapa Cerrados, 2002. Planaltina, DF.

RINCÓN, Laura Emilia Cerón; GUTIÉRREZ, Fabio Aristizábal. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo em suelos. **Revista Colombiana de Biotecnología**. v.XIV. n1. p.285-295. Julho, 2012.

ROCHA, Gisele Pinto. **Bactérias Associativas e Simbiontes dos Nódulos de *Arachis pintoi* (LEGUMINOSAE)**. Dissertação de mestrado. Feira de Santana, BA. 2007.

ROSATO, A.S.; WOLTERS, A.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Quantitative analysis of Paenibacillus azotofixians in soil and rhizosphere of wheat using MPN-PCR. In: **International Symposium On Sustainable Agriculture Of The Tropics - The Role Of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.228-229, 1995.

SANTOS, Ellen Ribeiro Martins dos. **Diversidade de bactérias em nódulos de *Inga vera willd.* (leguminosae-mimosoideae) do sul da Bahia**. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – Bahia – Brasil Março de 2010

SILVA, A. F.; et al. Efeito da inoculação da soja (Cultivar Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p.1327-1333, 2002.

SILVA, Michele Aparecida Pereira da. **Diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes**

leguminosas da região do Alto Solimões, AM. Lavras, UFLA. 2010. 82p.

SHIRAIISHI, A.; et al. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology.** v.33, p.269-274, 2010.

SONEGO, Rubia Cristina; BACKES, Albano; SOUZA, Alexandre F. **Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-paramétricos de riqueza e rarefação de amostras.** Acta Botânica Brasílica. vol.21 no.4. São Paulo. Dezembro, 2007

SOUZA, Luiz Augusto Gomes de; et al. Desenvolvimento e Nodulação Natural de Leguminosas Arbóreas em Solos de Pernambuco. **Pesquisa agropecuária brasileira,** Brasília, v.42, n.2, p.207-217, fev. 2007

SOUZA, Luiz Augusto Gomes de. **Levantamento da habilidade nodulífera e fixação simbiótica de N₂ nas Fabaceae da região Amazônica.** Enciclopédia Biosfera, centro científico conhecer. Goiânia, vol.6, N.10, 2010.

SOUZA, Luiz A. G. de; SILVA, Marlene F. da; MOREIRA, Francisco W. **Capacidade de nodulação de cem leguminosas da amazônia.** ACTA AMAZONICA, ed 24, pág 9-18. 1994. Disponível em: <http://acta.inpa.gov.br/fasciculos/24-2/PDF/v24n2a02.pdf>

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes.** Kew, Royal Botanic Gardens. 146p. 2001

SPRENT, J. I; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects.** 2^aed. University Press, Cambridge. 1990.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica – Rio de Janeiro-RJ: **Embrapa Agrobiologia**, n.93, 58p, 1999.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3^o ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p.719.

TEDESCO, Marino José; et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2^aed. Porto Alegre, RS. Departamento de solos, UFRGS. 1995.

URENHA, Luiz C. et al. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, Mariangela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de micorbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 1994.

VALDEZ, D. et al. Manganese application alleviates the water deficit-induced declined of N² fixation. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.497-505, 2000.

VANDAMME, P; et al. Burkholderia tuberum sp. nov. and Burkholderia phymatum sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Syst Appl Microbiol**. 2002 Dec;25(4):507-12.

VIBRANS, Alexander Christian; et al. **Floresta Ombrófila Mista**. In: Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina. V.3. Blumenau. Edifurb, 2013. 440p.

VIERA, Rosana Faria. Diversidade e taxonomia de rizobio. In: SILVEIRA, Adriana Parada Dias da; FREITAS, Sueli dos Santos. **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**. Instituto Agrônômico. Campinas, 2007.

WARD, D.M.; WLLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v.345, p.63-65, 1990.

WATZLAWICK, Luciano Faria et al. Estrutura, diversidade e distribuição espacial da vegetação arbórea na Floresta Ombrófila Mista em Sistema Faxinal, Rebouças (PR). **Ambiência**, Guarapuava (PR). v.7. n.3. p. 415-427. Set/dez. 2011.

WEISBURG, W.G; BARNS, S.M; PELLETIER, D.A; LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, 173(2): 697703. 1991.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

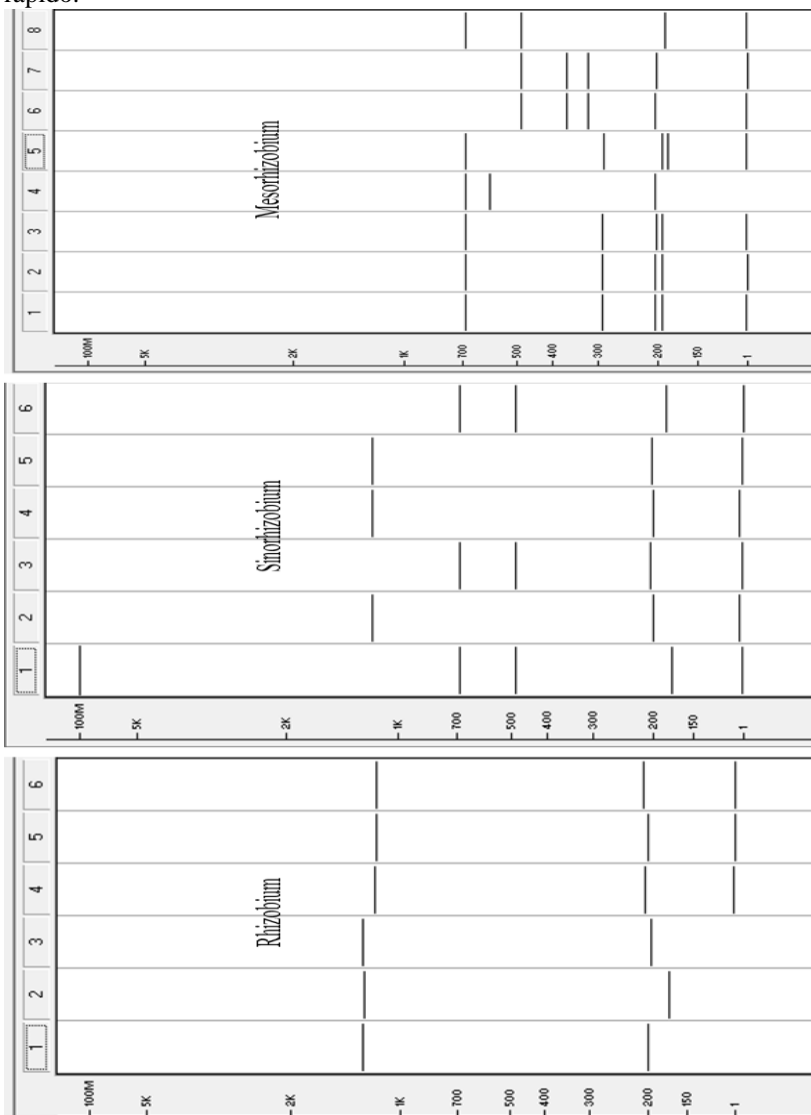
ZAKHIA, F; LAUJUDIE, P. **Taxonomy of Rhizobia**. Agronomie, v.21. n.6, p.569-576. 2001.

YANG, H.C., Im, W.T., Kim, K.K., An, D.S., Lee, S.T. 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56; 453-457

ZHANG, F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures. **Annals of Botany**, v.77, p.453 - 459, 1996.

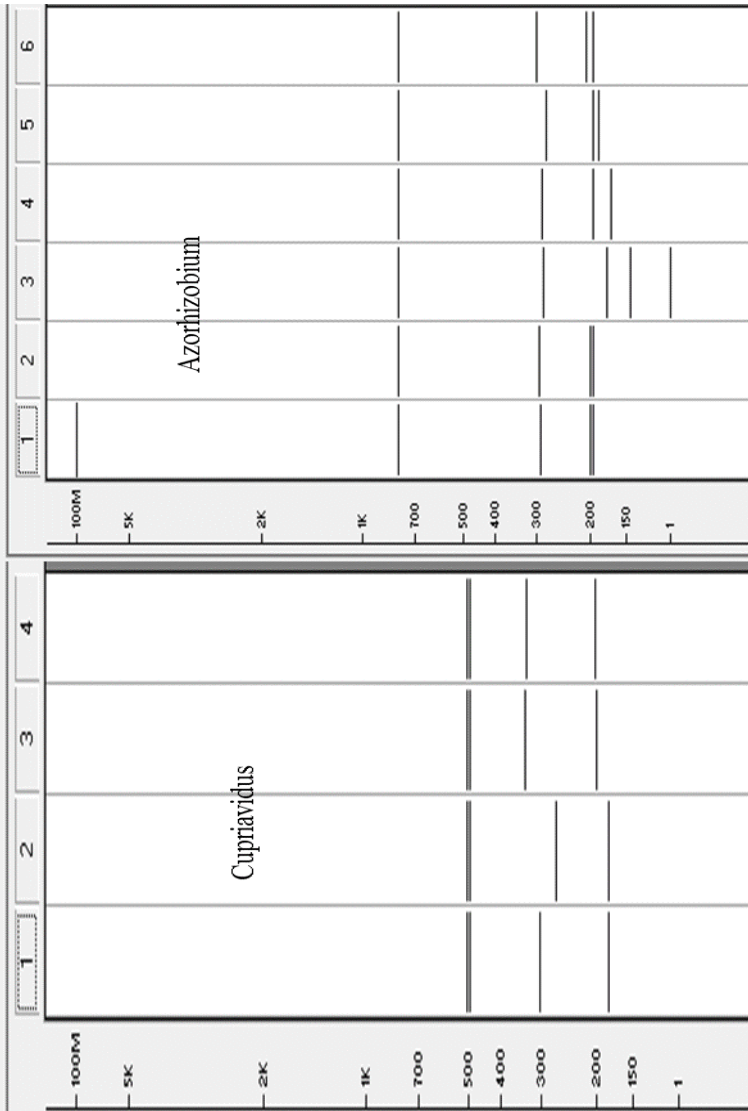
ANEXOS

Anexo 1. Corridas em sílico com a endonuclease de restrição *HinfI* e gêneros de microrganismos fixadores de nitrogênio com crescimento rápido.



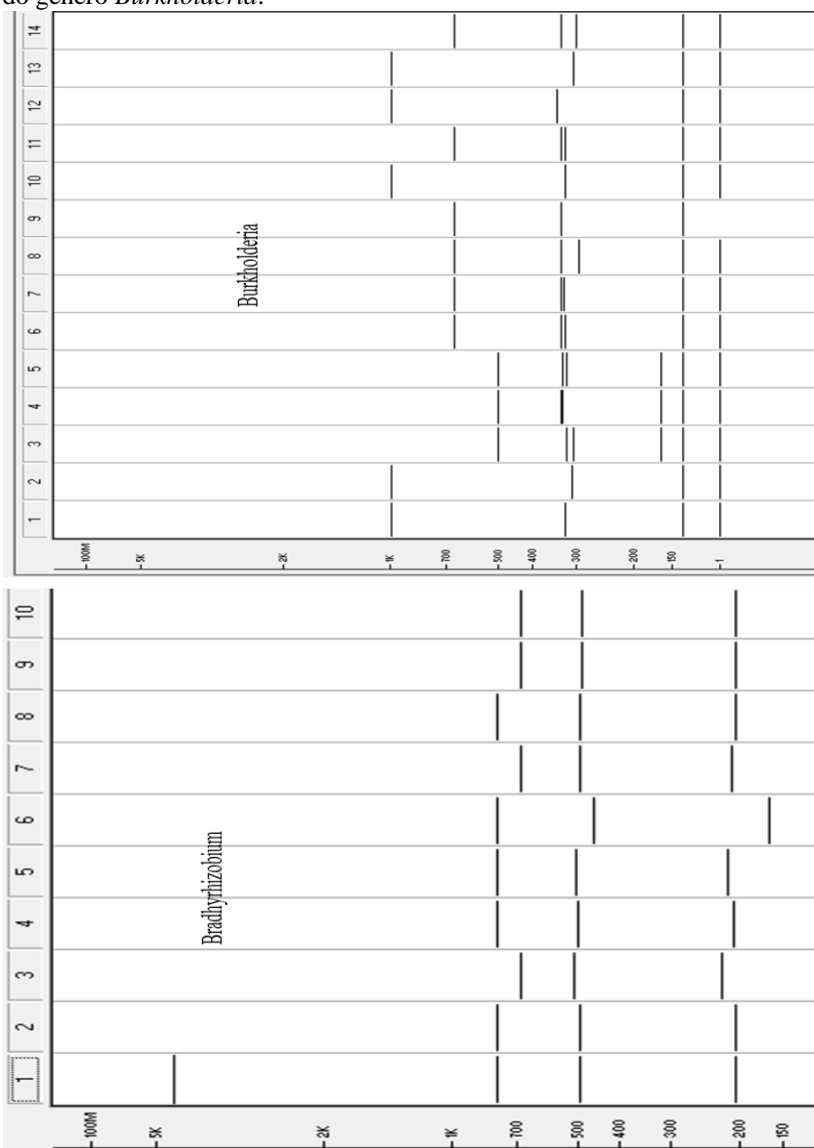
Fonte: Programa Vector NTI (UNOESC) e códigos Genbank

Anexo 2. Corridas em sílico com a endonuclease de restrição *HinfI* e gêneros de microrganismos fixadores de nitrogênio com crescimento intermediário.



Fonte: Programa Vector NTI (UNOESC) e códigos Genebank

Anexo 3. Corridas em sílico com a endonuclease de restrição *HinfI* e gêneros de microrganismos fixadores de nitrogênio com crescimento lento e do gênero *Burkholderia*.



Fonte: Programa Vector NTI (UNOESC) e códigos Genbank.

Anexo 4. Códigos Genbank dos microrganismos utilizados para a corrida em sílico.

Gênero *Azorhizobium*

Azorhizobium caulinodans NR_036941.1

Azorhizobium oxalatophilum NR_108517.1

Azorhizobium doebereineriae NR_041839.1

Azorhizobium johannae AY655487.1

Azorhizobium sp AY301011.1

Azorhizobium caulinodans NR_074185.1

Gênero *Bradyrhizobium*

Bradyrhizobium japonicum CP010313.1

Bradyrhizobium japonicum AY117677.1

Bradyrhizobium canariense EF694742.1

Bradyrhizobium canariense AY577427.1

Bradyrhizobium diazoefficiens NR_074322.1

Bradyrhizobium yuanmingense AB601625.1

Bradyrhizobium yuanmingense AB601626.1

Bradyrhizobium cytisi NR_116360.1

Bradyrhizobium liaoningens DQ497619.1

Bradyrhizobium lupini U69637.1

Bradyrhizobium elkamii AF293374.1

Gênero *Burkholderia*

Burkholderia cepacia AY741359.1

Burkholderia cepacia CP007787.1

Burkholderia dolosa CP009795.1

Burkholderia caribensis HQ023276.1

Burkholderia caribensis GU144372.1

Burkholderia terrae NR_041287.1

Burkholderia phymatum NR_074668.1

Burkholderia fungorum AB091188.1

Burkholderia terricola NR_029044.1

Burkholderia phytofirmans NR_102845.1

Burkholderia sp. JX174263.1

Burkholderia mimosarum AY773196.1

Burkholderia mimosarum AY752953.1

Burkholderia mimosarum HE864347.1

Burkholderia phenoliruptrix CP003863.1

Burkholderia phenoliruptrix NR_042901.1

Fonte: Genbank (2015)

Continuação

Gênero *Cupriavidus*

Cupriavidus basilensis CP010537.1
Cupriavidus gilardii NR_114460.1
Cupriavidus basilensis NR_025138.1
Cupriavidus taiwanensis CU633749.1

Gênero *Mesorhizobium*

Mesorhizobium loti KM192335.1
Mesorhizobium loti AB289613.1
Mesorhizobium loti AB367700.1
Mesorhizobium tianshanense NR_024880.1
Mesorhizobium amorphae JF913976.1
Mesorhizobium mediterraneum AY195844.1
Mesorhizobium tianshanense AY195846.1
Mesorhizobium sp. JX458416.1
Mesorhizobium tianshanense FJ025121.1

Gênero *Rhizobium*

Rhizobium giardinii KF028892.1
Rhizobium etli bv. *mimosae* DQ648575.1
Rhizobium etli bv. *mimosae* DQ648573.1
Rhizobium etli bv. *mimosae* CP006986.1
Rhizobium etli bv. *phaseoli* CP007641.1
Rhizobium tropici NR_102511.1
Rhizobium tropici EF054892.1

Gênero *Sinorhizobium*

Sinorhizobium americanum JQ342897.1
Sinorhizobium fredii AY260146.1
Sinorhizobium teranga HE681420.1
Sinorhizobium sp EU488744.1
Sinorhizobium sp JF772518.1
Sinorhizobium medicae NR_074254.1
Sinorhizobium xinjiangense D12796.1
Sinorhizobium sp EF599761.1
Sinorhizobium fredii AB195268.1

Fonte: Genbank (2015)