

SILMAR PRIMIERI

**SELEÇÃO E BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS NO
CRESCIMENTO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella*)**

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor no
Curso de Pós-graduação em Ciência do
Solo da Universidade do Estado de Santa –
UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pires
Santos

**LAGES, SC
2016**

Primieri, Silmar

Seleção e bioprospecção de microrganismos no crescimento de bracatinga (*Mimosa scabrella*)/
Silmar Primieri. - Lages, 2016.

112 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Julio Cesar Pires Santos

Inclui bibliografia

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2016.

1. Interações ecológicas a. 2. Fixação biológica de nitrogênio b. 3. Bracatinga c. 4. Simbiose d. I. Primieri, Silmar. 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.

SILMAR PRIMIERI

**SELEÇÃO E BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS NO
CRESCIMENTO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella*)**

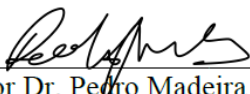
Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Professor Dr. Julio Cesar Pires Santos
Universidade do Estado de Santa Catarina/CAV

Membro: _____
Pesquisador Dr. Murilo Dalla Costa
Epagri, Lages/SC

Membro: _____
Professor Dr. Marcos R. D. Stroschein
Instituto Federal de Santa Catarina

Membro: _____

Professor Dr. Pedro Madeira Antunes
Universidade de Algoma, Canadá

Membro: _____
Pesquisador Dr. Enilson Saccol de Sá
Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS

Membro: _____
Pesquisador Dr. João Frederico Mangrich dos Passos
Epagri, Lages/SC

Lages, janeiro de 2016

“A mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Nesta parte gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

Ao meu orientador, Júlio Cesar Pires Santos, que acreditou na possibilidade deste estudo, possibilitou sua execução e facilitou as parcerias realizadas.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina, instituição em que desenvolvo minhas atividades profissionais, que apoiou financeiramente parte deste trabalho e forneceu duas bolsas de iniciação científica. A elas, Bianca Salete Branco e Evanise Chibilinski, estudantes do curso de Biotecnologia, que foram responsáveis pela preparação de meios, isolamentos de bactérias e acompanhamento dos experimentos, aqui vai meu agradecimento.

À EPAGRI e seus colaboradores, principalmente em nome do pesquisador Murilo Dalla Costa, que abriu as portas do laboratório de Biotecnologia para o desenvolvimento deste trabalho, desde o isolamento das bactérias, manutenção da coleção, uso de vidrarias e reagentes até a implantação de experimentos em câmara de crescimento e em casa de vegetação. Aqui vai um especial agradecimento.

Ao professor Pedro Madeira Antunes, da Algoma University, Canadá, que nos recebeu para a realização do doutorado sanduíche nesta instituição e financiou a identificação genética das bactérias e o experimento do terceiro capítulo desta tese, mas que, além disso, se tornou um grande amigo e colaborou com valiosas contribuições para a tese.

À Capes, pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

À minha esposa Agnes e minha filha Lorena pela compreensão em meus momentos de ausência e parceria em todas as etapas.

Por fim, a todos aqueles, que mesmo não mencionados, auxiliaram a realização deste estudo. Muito obrigado.

RESUMO

A simbiose de microrganismos nas raízes de plantas é uma relação ecológica importante para a sobrevivência de ambos. Para Bracatinga (*Mimosa scabrella*), planta leguminosa nativa do sul do Brasil, pioneira na Floresta Ombrófila Mista e com reconhecido potencial econômico, essas associações podem ser fundamentais para seu estabelecimento nos diferentes substratos, crescimento e sobrevivência. Este trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio coletadas de nódulos de *M. scabrella*, de diferentes regiões do estado de Santa Catarina, bem como a interação dessas com bactérias associativas e fungos micorrízicos arbusculares. O primeiro capítulo trata de uma breve revisão bibliográfica sobre o assunto. O segundo capítulo descreve a metodologia e área de coleta, bem como a análise da diversidade morfológica e genética das bactérias encontradas nos nódulos de *M. scabrella*. Neste capítulo, dentre os 61 pontos amostrados, 30 morfotipos foram identificados e agrupados em 11 grupos. Destes, bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Burkholderia* foram as mais comuns, no entanto, gêneros *Cupriavidus* e *Rhizobium* também foram identificados, além de diversos gêneros de bactérias associativas. O terceiro capítulo é resultado de dois experimentos, onde o primeiro demonstrou a eficiência e eficácia simbiótica de 28 estirpes inoculadas independentemente em plantas de *M. scabrella* e o segundo avaliou a eficiência de 2 estirpes em três diferentes progênies desta espécie. As estirpes do gênero *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Cupriavidus* foram capazes de formar nódulos em *M. scabrella*. No entanto, as bactérias do gênero *Cupriavidus* não fixaram N₂ para o planta. Em contrapartida, algumas bactérias do gênero *Burkholderia* mostraram capacidade de fixar todo o N₂ necessário para o crescimento da planta, embora os

resultados tenham grande variação em relação à estirpe de *Burkholderia* utilizada. Além disso, o acesso de *M. scabrella* pode influenciar na capacidade de fixação de N₂ da bactéria. O quarto capítulo avaliou os efeitos de fungo micorrízico arbuscular (FMA), bactéria fixadora de nitrogênio (BFN) e bactéria associativa (BA), individualmente e em combinação, no crescimento, concentração de nitrogênio, nodulação e arquitetura da raiz de *M. scabrella* cultivada em solo com baixo teor de fósforo. Os resultados demonstraram que a co-inoculação de FMA e BFN aumentaram a massa da matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas, bem como a concentração de nitrogênio. Em relação a arquitetura radicular, a co-inoculação afetou positivamente o comprimento e volume radicular, área superficial, número de bifurcações e pontas. Além disso, a inoculação de BA não afetou o crescimento de *M. scabrella*, embora o número de nódulos tenha diminuído com sua presença.

Palavras-chave: Interações ecológicas. Fixação biológica de nitrogênio. Recurso Genético Florestal.

ABSTRACT

The symbiosis between soil microorganisms and root plants is an important ecological relationship for their survival. For Bracatinga (*Mimosa scabrella*), a native leguminous plant in southern Brazil, pioneer in the Araucaria Forest and recognized with economic potential, these associations are essential for their establishment in different substrates, growth and survival. This study aimed to assess the diversity and symbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacteria collected from different sites in Santa Catarina, as well as their interaction with associative bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. The first chapter is a brief literature review about the subject. The second one describes the methodology applied in the collection area, as well as the morphological and genetic diversity analysis of bacteria found inside the *M. scabrella* nodules. In this chapter, among the 61 sample points, 30 morphotypes were identified and clustered into 11 groups. *Burkholderia* genus was the most common nitrogen-fixing bacteria in the nodules. However, *Rhizobium* and *Cupriavidus* genera have also been identified and different associative bacteria as well. The third section is the result of two experiments. The first one showed the symbiotic efficiency and effectiveness of 28 strains inoculated separately in *M. scabrella* plants and the second one assessed the symbiotic efficiency of two *Burkholderia* strains in three different progenies of *M. scabrella*. Strains of *Burkholderia*, *Rhizobium* and *Cupriavidus* genera were able to form nodules on *M. scabrella*. However, the *Cupriavidus* genus did not fixed N to the plant. In contrast, some *Burkholderia* strains showed good results as nitrogen fixing bacteria, with potential to fix all the N required by their host, although the results have had a wide variation in relation to the *Burkholderia* strains used. In addition, the progeny of *M. scabrella* may influence in the N fixation ability of bacteria.

The fourth chapter evaluated the effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), nitrogen fixing bacteria (NFB) and associative bacteria (AB) individually and in combination on growth, nitrogen concentration, nodulation and root architecture of *M. scabrella* cultivated in a low phosphorus content soil. The results showed that the co-inoculation of AMF and NFB increased the root and shoot dry matter and the nitrogen concentration of the plants. Regards to root architecture, co-inoculation affects positively the length and volume of the roots, surface area, number of bifurcations and tips. In addition, AB inoculation did not affect the *M. scabrella* growth, although the number of nodules decreased significantly.

Keywords: Ecological interactions. Biological nitrogen fixation. Bracatinga. Forest Genetic Resource.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa apresentando a distribuição da Floresta Ombrófila Mista no sul do Brasil (acima) e os locais de amostragem usados neste estudo (abaixo).....	42
Figura 2	Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas dos morfotipos apresentados na tabela 1, oriundas de nódulos de bracatinga. Grupos genotípicos representados pelas sequências do gene 16S rRNA avaliados para cada grupo.....	47
Figura 3	Árvore filogenética (Neighbor-joining) baseada nas sequências do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de nódulos de <i>M. scabrella</i> , incluindo bactérias similares obtidas do Genbank. Os valores de Bootstrap foram baseadas em 1.000 replicatas. Nomes das bactérias isoladas de nódulos de <i>M. scabrella</i> são precedidas pelo seu número de acesso e identificação do grupo morfológico.....	58
Figura 4	Mapa apresentando os locais de coleta de sementes A1 (26°16'3.80"S / 50°45'41.73"O), A2 (27°30'13.47"S / 50°07'43.50"O) e A3 (27°41'48.22"S / 49°02'56.53"O) e também os locais de coleta de onde as bactérias fixadoras de N ₂ foram isoladas, B2 (27°51'20.06"S / 50°21'43.06"O) e B3 (27°31'44.82"S / 49°28'52.42"O).....	67
Figura 5	<i>Mimosa scabrella</i> cultivada em condições axênicas inoculada com rizobactéria	70

	nodulífera.....	
Figura 6	Efeitos da co-inoculação com FMA <i>Glomus intraradices</i> (+M) e BFN <i>Burkholderia</i> sp. (+R) em <i>M. scabrella</i> . Massa da matéria seca da parte aérea e raiz depois de 3 meses de cultivo sob condições de câmara de crescimento. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). n=12. Barras indicam o erro-padrão.....	90
Figura 7	Microfotografia da presença de estruturas do FMA <i>Glomus intraradices</i> no interior do sistema radicular de <i>M. scabrella</i> . Setas indicam estruturas fúngicas como vesículas (v) e hifas (h).	91
Figura 8	Efeito da co-inoculação com FMA <i>Glomus intraradices</i> (+M) e BA <i>Burkholderia</i> sp. (+E) em <i>M. scabrella</i> . A) Número de nódulos e B) Massa seca de nódulos de raízes de <i>Mimosa scabrella</i> . Os valores apresentados são as médias (n=6) com erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0.05$).....	92
Figura 9	Colonização micorrízica total por <i>Glomus intraradices</i> (+M) e sua interação com bactéria associativa (+E) e bactéria fixadora de nitrogênio (+B) em <i>M. scabrella</i> . Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). n=6. Barras indicam erro-padrão	93
Figura 10	(A) Concentração de nitrogênio e (B) Acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA) em <i>M. scabrella</i> sob inoculação com bactéria fixadora de nitrogênio (+R) e fungo micorrízico arbuscular (+M). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). n=12. Barras indicam erro-padrão.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Morfotipos de rizobactérias isoladas de nódulos de bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>).....	45
Tabela 2	Resultados da busca no GenBank das sequências do gene 16S rRNA a partir das estirpes isoladas de nódulos de <i>M. scabrella</i>	51
Tabela 3	Nodulação e eficácia simbiótica de bactérias inoculadas em <i>M. scabrella</i> . As linhas em cada coluna que partilham a mesma letra não são estatisticamente diferentes, conforme determinado pela teste de Scott-Knott ($p < 0.05$).....	71
Tabela 4	Resultados da Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) de plantas de <i>M. scabrella</i> oriundas de diferentes progênies e inoculadas com bactérias fixadoras de N_2 . As linhas verticais significam o erro padrão em relação à amostra.....	74
Tabela 5	Arquitetura radicular de <i>Mimosa scabrella</i> após cultivo em condições de câmara de crescimento, inoculados (+) ou não (-) com fungo micorrízico arbuscular (M), com bactéria fixadora de nitrogênio (R) e bactéria associativa (E). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$).....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	Contexto sociocultural da <i>Mimosa scabrella</i>	28
2.2	Bactérias promotoras de crescimento em plantas....	29
2.3	Caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos.....	32
2.4	Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos	34
3	VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS DE NÓDULOS DE BRACATINGA	37
	RESUMO	37
	ABSTRACT	38
3.1	INTRODUÇÃO	39
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.1	Isolamento das bactérias.....	41
3.2.2	Caracterização morfológica.....	43
3.2.3	Extração do DNA, amplificação e identificação.....	43
3.2.4	Nucleotide sequence accession numbers	44
3.2.5	Análise dos dados.....	44
3.3.	RESULTADOS	45
3.3.1	Isolamento bacteriano e caracterização morfológica.	45
3.3.2	Análise filogenética	48
3.4	DISCUSSÃO	50
3.5	CONCLUSÃO	54

3.6	REFERÊNCIAS	55
4	EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i>) E TESTE EM DIFERENTES ACESSOS DE <i>Mimosa scabrella</i>.....	62
	RESUMO	62
	ABSTRACT	63
4.1	INTRODUÇÃO	64
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.2.1	Origem das bactérias e sementes.....	66
4.2.2	Experimento I: Eficiência simbiótica de rizobactérias isoladas de nódulos de Bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i> Benth.).	67
4.2.3	Experimento II: Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de N ₂ em diferentes progênies de <i>Mimosa scabrella</i>	68
4.2.4	Colheita e variáveis analisadas.....	69
4.2.5	Análise estatística.....	69
4.3	RESULTADOS.....	69
4.4	DISCUSSÃO.....	74
4.5	CONCLUSÃO.....	76
4.6	REFERÊNCIAS.....	78
5	INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZAS ARBUSCULARES, BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO E BACTÉRIA ASSOCIATIVA NO CRESCIMENTO DE <i>Mimosa scabrella</i>, FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E ARQUITETURA DE RAIZ.....	82
	RESUMO	82

ABSTRACT	82
5.1 INTRODUÇÃO	83
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	86
5.2.1 Organismos estudados.....	86
5.2.2 Delineamento experimental e condições de crescimento.....	87
5.2.3 Colheita e variáveis analisadas.....	88
5.2.4 Análise estatística	89
5.3 RESULTADOS.....	89
5.3.1 Crescimento da planta.....	89
5.3.2 Colonização micorrízica e nodulação por BFN.....	91
5.3.3 Acúmulo de nitrogênio.....	93
5.3.4 Arquitetura radicular.....	95
5.4 DISCUSSÃO.....	96
5.5 CONCLUSÃO.....	99
5.6 REFERÊNCIAS.....	100
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7 REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é um dos recursos florestais nativos do Sul do Brasil mais manejado por agricultores familiares de Santa Catarina. No levantamento socioambiental do inventário florestal de Santa Catarina, a bracatinga foi a principal árvore citada como espécie madeirável e a mais importante para uso doméstico, principalmente na serra catarinense (MÜLLER, 2011). Embora tenha uma série de atributos interessantes e seja uma espécie adaptada às condições edafoclimáticas do Sul do Brasil, existe muita desconfiança no uso da bracatinga em formações florestais, sendo preterida por espécies exóticas como o pinus. Como é uma espécie nativa, a bracatinga está amparada legalmente pela legislação ambiental; a Lei da Mata Atlântica de 2006 veta a possibilidade de manejo de espécies nativas em florestas naturais (SIMINSKI et al., 2007).

Sistemas produtivos com o manejo da bracatinga, uma vez compatibilizados com aspectos legais pertinentes à legislação ambiental, apresentam viabilidade econômica e podem constituir uma fonte de renda para agricultores e produtores florestais, além de ser uma alternativa a espécies madeiráveis exóticas. O uso de inoculantes microbianos, especialmente com base em bactérias formadoras de nódulos em leguminosas, é uma biotecnologia de sucesso no Brasil. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) promove uma diminuição considerável de custos em sistemas de produção agrícola, graças à redução da necessidade de adubação nitrogenada. O exemplo mais contundente é na cultura da soja, em vista da área expressiva de cultivo em relação a outras espécies leguminosas. Contudo, as pesquisas sobre FBN em leguminosas arbóreas são menores em comparação a estudos com culturas anuais. Atualmente não existem estirpes bacterianas eficientes recomendadas pelo Ministério da

Agricultura, Pecuário e Abastecimento (MAPA) para a inoculação de sementes da bracatinga (BRASIL, 2011).

Aliado aos esforços de trabalhos de desenvolvimento de sistema produtivos com manejo da bracatinga, o uso de inoculantes microbianos contendo estirpes bacterianas eficientes na FBN pode auxiliar no desenvolvimento de mudas em viveiros e das plantas a campo. Assim, o emprego de uma biotecnologia de baixo custo e impacto ambiental quase nulo pode auxiliar no crescimento da planta e facilitar seu manejo nas áreas de plantio. Para chegar a esse ponto, são necessários trabalhos de seleção das estirpes em diferentes níveis ou estágios, seguindo-se orientações técnicas preconizadas pela RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Este projeto visa atender uma demanda prática, pela necessidade de inoculantes bacterianos eficientes na FBN e no crescimento da bracatinga.

Este trabalho foi desenvolvido visando o levantamento e seleção de rizobactérias nodulíferas em bracatinga (*Mimosa scabrella*). Desta maneira buscou-se isolar diferentes rizobactérias de nódulos desta espécie, testar a eficiência simbiótica das bactérias fixadoras de nitrogênio e avaliar a interação dessas bactérias com outros microrganismos, tais como fungos micorrízicos arbusculares e bactérias associativas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contexto sociocultural da *Mimosa scabrella*

A *Mimosa scabrella*, popularmente conhecida como bracatinga, é uma árvore perenifólia de tronco reto que pode chegar à mais de 25m de altura e 50cm de DAP na idade adulta. Sua ocorrência natural é nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. No entanto, esta espécie já foi introduzida em vários países da América Latina, África e Europa (CARVALHO, 2002).

Espécie nativa de clima frio, tem ocorrência restrita na Floresta Ombrófila Mista, onde se comporta como pioneira, desenvolvendo-se a céu aberto, resistindo às geadas e propiciando condições para o aparecimento de espécies que necessitam de maior umidade e ambiente mais sombreado. Dessa forma, participa das diferentes fases de sucessão na recomposição da mata (EMBRAPA, 1983).

Ao longo da história de ocupação do estado de Santa Catarina, a Floresta Ombrófila Mista ou Mata de Araucária foi alvo de intensa exploração madeireira e uma grande mudança no uso do solo foi configurada, estando atualmente com menos de 1% do remanescente total dessa floresta (CARVALHO, 2002).

Embora com importância econômica não registrada para o setor caracterizado como o agronegócio, a bracatinga vem sendo explorada sistematicamente por agricultores familiares em Santa Catarina, com significativo impacto na permanência das famílias no campo. Steenbock (2009), em pesquisa com vinte e quatro famílias de diferentes assentamentos da reforma agrária no estado de Santa Catarina, verificou que o manejo de bracatingais e a produção de carvão representam, em média, quase 50% da renda familiar. O autor constatou que a espécie é manejada há mais de um século e

atualmente ainda é utilizada de forma ilegal pelos moradores de áreas rurais, principalmente como lenha e também nos assentamentos da reforma agrária, como alternativa econômica, na produção de carvão vegetal. Esse recurso florestal tem múltiplas utilidades: na produção apícola de mel e melato, como espécie paisagística, na produção de celulose, na indústria madeireira, como palanques e escoras, na recuperação de áreas degradadas e como fonte de energia (EMBRAPA, 1988; MAZUCHOWSKI et al., 2014). Além disso, as folhas da bracatinga podem ter mais de 19% de proteína bruta e é consumida pelos ruminantes no período hibernar quando há restrição das pastagens (FREITAS et al., 1994; CARVALHO 2002).

De acordo com Carpanezzi (1992), o consórcio de culturas agrícolas com bracatinga garante a produção de lenha e produtos alimentícios e, há décadas, um ambiente socioeconômico característico da região do Planalto Serrano catarinense. Como recurso bioenergético, a opção para o uso da bracatinga consiste na fabricação de carvão, apresentando ótimo desempenho, por possuir densidade básica (entre 0,55 - 0,77 g/cm³), elevados teores de lignina e carbono fixo, e um rendimento de carvão de 28,2% (LISBÃO JR., 1981).

Além disso, a madeira de bracatinga vem sendo comercializada sob a denominação de “Amêndola” em São Paulo e Rio de Janeiro, que visa valorizar a madeira, visto que seu nome original está vinculado à geração de energia, como lenha (MAZUCHOWSKI, 2015)

2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

A bracatinga pertence à família botânica Fabaceae e, como outras espécies leguminosas, forma, nas raízes, associação simbiótica com bactérias diazotróficas, em estruturas denominadas de nódulos. Em troca de nutrientes e energia, as bactérias reduzem nitrogênio atmosférico (N₂) a

amônia (NH_3) que uma vez transferido aos tecidos vegetais pode ser metabolizado em aminoácidos e proteínas. Esse processo, denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), permite a reciclagem de um dos nutrientes mais importante para os seres vivos e promove diminuição e até supressão de aplicação de fertilizantes nitrogenados nos sistemas produtivos.

Graças aos benefícios da fixação biológica de nitrogênio é obtida uma economia estimada em US\$ 2,5 bilhões ao ano, apenas na cultura da soja (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). A FBN constitui a principal entrada do nutriente na biosfera, sendo alvo de muitos estudos no campo da biologia devido a esse papel na ciclagem biogeoquímica. A síntese enzimática é restrita ao metabolismo de procariontes diazotróficos, sendo realizado por bactérias de vida livre e por bactérias vivendo em associação com plantas. Nessa última situação, os casos mais comuns e estudados são de simbioses decorrentes da infecção de plantas da família Fabaceae por bactérias da família Rhizobiaceae - que compreende diversos gêneros, como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (GLYAN'KO, 2015).

A capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN), não é comum a todas as espécies de leguminosas. Muitas espécies não possuem essa característica; entre elas, pode-se citar o jatobá (*Hymenae courbaril*) e o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*). Além disso, para a maioria das espécies não são disponíveis informações sobre essa característica. Levantamentos intensivos no campo, casa de vegetação e viveiro têm sido realizados para verificar a capacidade de nodulação em leguminosas, principalmente em áreas tropicais. No Brasil, vários gêneros de espécies florestais foram estudados nos últimos anos e vários gêneros nodulíferos e não nodulíferos foram descobertos. Estima-se que cerca de 23% de todas as espécies de Fabaceae no mundo (considerando o número total de 16.567 espécies na família) já foram estudadas a esse

respeito e que destas, 88% são nodulíferas. A maioria das espécies não nodulíferas são da família Caesalpinioideae. Nesse grupo, 76% das espécies examinadas são incapazes de estabelecer a simbiose com bactérias. Em Mimosoideae e Papilionoideae, o número de espécies não nodulíferas é bem menor; das espécies examinadas, até o momento, 13 e 4% são incapazes de nodular, respectivamente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Trabalhos recentes demonstram que leguminosas arbóreas, particularmente do gênero *Mimosa*, não são noduladas exclusivamente por membros Rhizobiaceae, mas também por membros de Beta-proteobacteria, como constatados em isolados de *Mimosa pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* e *M. scabrella* (CHEN et al., 2001; VANDAMME; COENYE, 2004; CHEN et al, 2007; GYANESHWAR et al., 2011). Esses resultados indicam que a diversidade de procariotos que realizam simbiose em leguminosas arbóreas pode ser muito mais ampla que o previsto e certamente conduzirão a avanços significativos no conhecimento da origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio, assim como sua manipulação pelo ser humano (STROSCHEIN, 2011).

O gênero *Mimosa* engloba mais de 500 espécies, sendo a maioria encontrada nas Américas, principalmente no Brasil. Embora a capacidade de nodular com uma variedade de rizóbios seja conhecida, poucas estirpes foram classificadas até o ano 2000, e todas consideradas do gênero *Rhizobium*. Em parte, essa classificação se deu pela utilização de critérios clássicos na identificação bacteriana, como taxa de crescimento e produção de ácidos. No exame do quadro de estirpes nodulíferas do gênero *Mimosa* da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia previamente catalogadas como *Rhizobium sp*, utilizando-se sequências de 16S RNAr, foi demonstrado que essas estirpes pertenciam ao gênero *Burkholderia* (DOS REIS JUNIOR et al. 2006).

No Brasil, até chegar ao nível de recomendação de determinada estirpe como inoculante para uma espécie de leguminosa, é necessário uma série de estudos seguindo-se orientações técnicas preconizadas pela RELARE. Os trabalhos de avaliação da eficiência simbiótica de estirpes bacterianas são realizados em condições controladas, em casa de vegetação com solução nutritiva ou solo em vasos. A partir de estirpes selecionadas nas condições controladas é conduzida a avaliação de eficiência agrônômica, a campo.

Estudos da Embrapa com a inoculação de isolados bacterianos nos respectivos hospedeiros vegetais constatou níveis de eficácia e eficiência simbiótica variáveis de acordo com a espécie de leguminosa arbórea. Eficácia e eficiência simbiótica são parâmetros estimados pela razão entre o crescimento das plantas quando inoculadas com determinado isolado bacteriano e as plantas dos tratamentos controles com e sem nitrogênio, respectivamente (DE FARIA; UCHÔAS, 2007). Na bracatinga, alcançou-se até 40% de eficácia nas estirpes selecionadas, valor relativamente baixo em comparação a outras espécies de *Mimosa*, como *M. caesalpiniiifolia* e *M. acutistipula*, com eficácia acima de 120 e 150%, respectivamente. É interessante destacar que as seleções de estirpes em bracatinga nesses trabalhos foram realizadas em condições controladas e até o momento somente um trabalho é relatado para a avaliação de eficiência agrônômica a campo em *Mimosa* spp (DOS REIS JR. et al., 2010). Para *M. scabrella*, nenhuma estirpe bacteriana está listada como recomendada para uso no Brasil, que é regulamentado pela instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (BRASIL, 2011).

2.3 Caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos

A nodulação apresenta-se de forma diferenciada nas famílias das leguminosas e é demonstrado também por meio de

diferentes tipos de nódulos encontrados na planta hospedeira. O mais comum é o esférico, encontrado nas leguminosas de grãos, como o caupi e a soja. Mas em espécies florestais podem ser encontrados também nódulos ramificados, digitiformes, de crescimento indeterminado, que podem alcançar tamanhos bem maiores (MOREIRA et al, 2010).

Da mesma forma que os nódulos têm formatos diferentes, as rizobactérias presentes nessa estrutura podem apresentar características distintas durante seu crescimento. As características morfológicas e culturais das espécies de rizobactérias fornecem informações importantes para identificação e agrupamento e revelam uma diversidade bastante ampla dos isolados, a qual costuma estar relacionada com estudos a nível de DNA (MARTINS et al., 1997).

O uso de técnicas moleculares para amplificar e identificar determinados genes é cada vez mais frequente e resultou em uma verdadeira revolução na taxonomia de bactérias e fungos. Os genes ribossomais são os mais usados, pois são encontrados em todos os seres vivos, expressam estruturas secundárias conservadas, são abundantes nas células e, como as diferenças nesses genes evoluem em taxas diferentes, permitem que análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010).

As técnicas de sequenciamento permitem a identificação desses microrganismos e têm sido largamente utilizadas, principalmente devido ao fato de que os dados podem ser submetidos a bancos de dados em todo mundo, permitindo a comparação com resultados anteriores. Essas sequências possibilitam também a revisão de sequências já depositadas nesses bancos de dados, bem como a evolução da taxonomia em procariotos pela realocação de microrganismos em grupos diferentes aos que estavam situados e pela divisão de grupos maiores em subgrupos (SPRENT, 2001).

2.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos

A capacidade de associação da bracatinga com microrganismos do solo, mais precisamente bactérias nodulíferas, é relatada em diversos trabalhos (MENDES FILHO et al., 1981; CHEN et al, 2003; CHEN et al, 2007; MOREIRA et al., 2010; LAMMEL et al., 2013) e já foi discutida acima. De forma semelhante, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem se associar às raízes e auxiliar no desenvolvimento mais rápido das plantas. Os FMA são organismos biotróficos, simbiontes obrigatórios, que se associam com raízes de plantas terrestres, epífitas e aquáticas e agem como uma extensão do sistema radicular das plantas. Tal associação potencializa a absorção de nutrientes, principalmente aqueles que apresentam menor mobilidade no solo, como o fósforo, ou incrementando a absorção de água sob condições de estresse hídrico (MOREIRA et al, 2010). Além disso, podem aumentar a tolerância da planta hospedeira à ataques de patógenos, como demonstrado no trabalho de Lewandowski, Dunfield e Antunes, (2013).

A capacidade de FMA colonizarem uma determinada planta varia de acordo com o isolado fúngico, a espécie vegetal e as condições ambientais, o que explica resultados algumas vezes contraditórios. Assim, estudos sobre as melhores combinações fungo-hospedeiro são necessários para que se possa alcançar o controle da micorrização (LIMA et al, 2010).

A eficiência da FBN pode ter relação direta com a presença de micorrizas. Bracatinga forma micorriza do tipo arbuscular, conforme relatado por Andrade et al. (2000), que encontrou estruturas típicas, como arbúsculos, hifas intracelulares e vesículas nas raízes. Essa simbiose mutualística é de ocorrência generalizada na natureza e é formada entre determinados fungos do solo do filo Glomeromycota (SCHÜSSLER; KLUGE, 2001). Um dos efeitos mais pronunciados das micorrizas é o aumento na absorção de

nutrientes e água pelas hifas do fungo, que são disponibilizados ao hospedeiro vegetal em troca de fotossintatos (SMITH; READ, 2010).

Assim, micorrizas podem potencializar a absorção de nutrientes, principalmente aqueles que apresentam menor mobilidade no solo, como o fósforo, ou incrementar a absorção de água em condições de estresse hídrico (MOREIRA et al., 2010). Além disso, micorrizas podem aumentar a tolerância da planta hospedeira aos ataques de patógenos, como demonstrado no trabalho de Lewandowski et al. (2013), em que plantas micorrizadas de crisântemo (*Leucanthemum vulgare*) apresentaram 91% maior acúmulo de matéria seca na parte aérea em relação às plantas apenas infectadas com fungo patogênico (*Rhizoctonia solani*).

Espécies de leguminosas podem apresentar grande dependência de FMA para desenvolvimento e nodulação, apresentando problemas de crescimento nas condições normais de seleção de estirpes de BFN, mesmo sob adubação nitrogenada (JESUS; SCHIAVO; FARIA, 2005). Lammel et al., (2007) verificaram colonização micorrízica arbuscular em bracinga tanto em áreas de reflorestamento como em áreas de regeneração natural. A resposta dessa espécie à inoculação com FMAs no acúmulo de biomassa foi considerada muito alta por Zangaro et al. (2003), sendo que a bracinga respondeu positivamente à inoculação micorrízica.

Dessa forma, as simbioses de leguminosas com FMA e BFNN apresentam grande potencial e são muito estudadas, em função dos benefícios que podem gerar. Moreira et al (2010), relataram inúmeros experimentos que têm demonstrado que plantas que vivem em simbiose com FMA e BFNN desenvolvem autossuficiência em nitrogênio e maior capacidade de absorver nutrientes e água. Essa combinação enriquece o solo com a deposição de matéria orgânica permitindo que espécies não leguminosas possam se estabelecer. Dessa forma, leguminosas co-inoculadas podem

ser usadas na recuperação de áreas degradadas, estabilidade de ecossistemas e sistemas agroflorestais.

Jesus; Schiavo; Faria, (2005) demonstraram que algumas espécies de leguminosas mostram grande dependência a micorrizas para seu desenvolvimento e nodulação e podem ter problemas de crescimento nas condições normais de seleção de estirpes de BFN, mesmo em condições de adubação nitrogenada. Sendo assim, recomenda-se que experimentos de seleção de estirpes devam contar com tratamentos que tenham a presença de FMA (MOREIRA et al, 2010).

3 VARIABILIDADE GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE RIZOBACTÉRIAS DE NÓDULOS DE BRACATINGA

RESUMO

A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é uma árvore leguminosa nativa do sul do Brasil, com grande potencial econômico como fonte de biomassa e madeira. Pouco se sabe sobre a diversidade de bactérias que ocorrem dentro dos nódulos dessa espécie. Foram isoladas 288 colônias bacterianas de nódulos radiculares coletados de *M. scabrella* em 61 pontos localizados em área de ocorrência natural da espécie. Colônias bacterianas foram isoladas em meio de cultura LMA e avaliadas quanto a suas características morfológicas e genéticas. Os 30 morfotipos encontrados foram agrupados em 11 grupos e pelo menos um isolado de cada grupo teve o gene 16S rRNA sequenciado. As características morfológicas predominantes foram: colônias de crescimento rápido e borda circular (99,3%); menores que 1 mm (66%); opacas (83%); puntiformes e achatadas (72%); brancas (81%); com capacidade de acidificação de meio de cultura (81%), alcalinizaram (12%) e pH neutro (7%); produtoras de pouco muco (76%) e grande quantidade de muco (15%). Baseados nessas características, alguns grupos formados foram restritos a determinadas mesorregiões do estado. O sequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que *M. scabrella* associa-se com diferentes bactérias nodulíferas e bactérias associativas e não houve relação entre as análises morfológicas e genéticas. Os isolados relacionados ao gênero *Burkholderia* foram os mais comuns. Pela primeira vez, o gênero *Cupriavidus* foi encontrado em nódulos de *M. scabrella* e juntamente com o gênero *Rhizobium*, também identificado em um dos nódulos,

foram os gêneros encontrados pelo sequenciamento, com capacidade de formar nódulos. As bactérias associativas isoladas dos nódulos corresponderam aos gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, e, pela primeira vez em *M. scabrella*, os gêneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Serratia* e *Arthrobacter*.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, 16S rRNA, bactérias associativas, *Burkholderia*.

ABSTRACT

Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) is a leguminous tree native to southern Brazil with high economic potential as a source of timber and biomass. Little is known about the diversity of bacteria in the root nodules. We isolated 288 bacterial colonies from root nodules collected from *M. scabrella* in 61 locations across its native range. Strains were isolated in LMA media and characterized according to morphological traits and 16S rRNA sequencing. The 30 morphotypes were clustered into 11 groups according to morphological traits and, at least, one isolate from each group had your 16 rRNA gene sequenced. Regarding to morphologic traits, 99.3% had circular colony edge and rapid growth time; 66% less than 1mm in diameter; 83% consisted of opaque colonies; 72% were punctiform in shape; 81% were white; 76% were low and 15% high mucus producing strains; 81% acidified the medium, 12% made it alkaline and 7% were pH neutral. Using the above traits, isolated strains were restricted to a specific geographic region. *Mimosa scabrella* associated with different N₂ fixing and endophytic bacteria. Strains closely related to *Burkholderia* genus were the main N₂ fixing bacteria. For the first time, the *Cupriavidus* genus was found

nodulating *M. scabrella*, and, together with *Rhizobium* genus, also identified inside the nodules, were the genera sequenced as capable to form nodules. Endophytic bacteria detected in the nodules corresponded to the genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, and, for the first time, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Serratia* and *Arthrobacter*.

Keywords: Biological nitrogen fixation; 16S rRNA; Associative bacteria, *Burkholderia*.

3.1 INTRODUÇÃO

Bracatinga (*M. scabrella* Bentham, Fabaceae) é uma espécie árvore leguminosa de crescimento rápido nativa da Floresta de Araucária (Floresta Ombrófila Mista), no sul do Brasil, um ecossistema subtropical localizado em uma região com temperaturas relativamente baixas, às vezes abaixo de zero e de alta precipitação (MAZUCHOWSKI et al., 2014). Esta espécie tem sido intencionalmente introduzida em sistemas florestais e agroflorestais na América do Sul e Central (Argentina, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, El Salvador, Nicarágua, Honduras e México), África (Etiópia, Quênia, Ruanda, Senegal, Uganda e Congo) e Europa (Espanha) (DAHMER et al., 2013). Outras espécies do gênero *Mimosa* são invasoras notórias (PARKER et al., 2007; CHEN et al., 2005) e a avaliação de risco deve ser realizada antes da introdução de *M. scabrella* fora de sua área nativa. *Mimosa scabrella* é uma espécie pioneira nos primeiros estágios de sucessão desse ecossistema e domina as comunidades sobre perturbação. Nessas áreas, ela pode formar populações de alta densidade, chamados de “bracatingais” (MOREIRA et al., 2011).

Mimosa scabrella é um importante recurso para os pequenos agricultores do sul do Brasil. Plantas vivas são essenciais para a produção de um mel ou melato de alto valor,

típico do sul do Brasil (BARTH, 2004) e são usadas na recuperação florestal (FERREIRA et al., 2013; AUMOND; LOCH; COMIM, 2012). A madeira pode ser utilizada na construção civil, mas, geralmente, é usada como fonte de energia (MAZUCHOWSKI et al., 2014; MÜLLER, 2011). No entanto, devido à legislação ambiental inadequada, a falta de investimento em educação e em tecnologia específica para espécies nativas economicamente relevantes, os agricultores substituem os "bracatingais" para usos do solo atualmente mais rentáveis, incluindo a pecuária e reflorestamento com espécies exóticas como *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. (STEENBOCK et al., 2011).

Como outras espécies de leguminosas, *M. scabrella* forma associações com bactérias fixadoras de nitrogênio em suas raízes (GYANESHWAR et al., 2011). No entanto, apesar de relatos de que diferentes bactérias fixadoras de N_2 e associativas ocorrem em nódulos de *Mimosa* sp., pouco se sabe sobre essa diversidade bacteriana. O gênero *Mimosa* pode associar-se com diferentes α - e β - subclasses de Proteobacteria (CHEN et al., 2003). Entretanto, *Burkholderia* sp. tem sido a principal bactéria identificada em nódulos de *Mimosa pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* e *M. scabrella* (VANDAMME; COENYE 2004; CHEN et al., 2007; LAMMEL et al., 2013). Além disso, cepas dos gêneros *Cupriavidus* e *Rhizobium* também foram identificadas como nodulíferas em diversas espécies de *Mimosa* (BARRETT; PARKER, 2006; ELLIOTT et al., 2009) e *Pseudomonas* e *Pantoea* como bactérias associativas presentes nos nódulos de *M. scabrella* (EHRHARDT-BROCARDO, 2013; LAMMEL et al., 2013).

O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade morfológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de *M. scabrella* coletadas em diferentes localidades, distribuídas na área de ocorrência natural da espécie no sul do Brasil. Nós hipotetizamos que: 1) nódulos de *M. scabrella* contém maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias

associativas que as conhecidas atualmente e; 2) diversidade morfológica bacteriana é consistente com a diversidade genética.

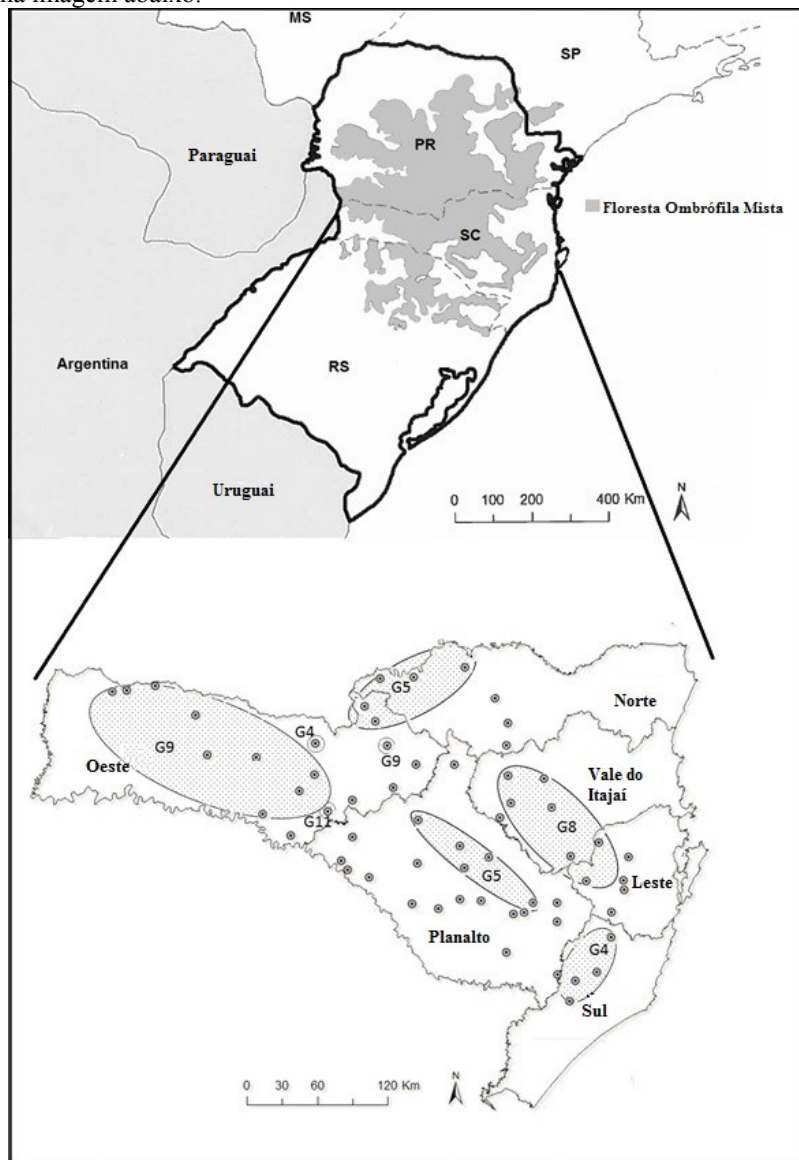
3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento das bactérias

Os nódulos foram coletadas diretamente de um ou mais indivíduos de *M. scabrella* em áreas de ocorrência natural dessa espécie, na Floresta Ombrófila Mista. Os locais de coleta foram aleatoriamente selecionados cobrindo uma área representativa de ocorrência dessa espécie, incluindo o estado de Santa Catarina (Fig. 1). Os procedimentos para o isolamento das bactérias foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Epagri, em Lages. O laboratório está localizado no centro do estado, reduzindo assim o tempo de transporte entre a coleta dos nódulos e o isolamento de bactérias, que foi no máximo de 24 horas depois da coleta. Para cada ponto de amostragem, raízes com nódulos foram coletadas de diferentes árvores, agrupados em saco plásticos, identificados, refrigerados e transportados sob gelo.

Cinco nódulos foram selecionados de cada ponto de amostragem, desinfetados superficialmente com etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos e lavados com água estéril por 5 vezes; logo após, macerados e riscados com auxílio de alça de platina em placas de Petri contendo meio levedura manitol ágar (LMA) e vermelho congo (VICENT, 1970). A desinfecção superficial foi confirmada através do plaqueamento, em meio LMA, da água resultante da última lavagem. As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente até o aparecimento de colônias bacterianas e, quando necessário, foram repicadas até o isolamento de colônias puras.

Figura 1. Mapa apresentando a distribuição da Floresta Ombrófila Mista no sul do Brasil (acima) e os locais de amostragem usados neste estudo (abaixo). Grupos de morfotipos com distribuição restrita estão destacados na imagem abaixo.



3.2.2 Caracterização morfológica

Após o isolamento procedeu-se à caracterização morfológica das colônias bacterianas, conforme Martins et al. (1997). As colônias foram avaliadas durante sete dias em placas de Petri contendo meio LMA para as seguintes características: tempo de crescimento (rápido: até 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias e lento: acima de 6 dias); tamanho (<1mm ou >1 mm); cor (branca ou outra); transparência (transparente ou opaca); forma (circular ou puntiforme); borda (circular ou irregular); elevação (achatada ou elevada); volume, consistência e aparência do muco e mudanças no pH em meio LMA com indicador de pH azul de bromotimol (ácido, neutro e alcalino).

3.2.3. Extração do DNA, amplificação e identificação

Aproximadamente uma em cada oito bactérias foram selecionadas aleatoriamente em todos os grupos morfológicos distintos totalizando 38 isolados. Pelo menos uma estirpe de cada um dos 11 grupos morfolologicamente distintos foi selecionada para sequenciamento do gene 16S rRNA. As bactérias foram cultivadas em meio líquido LM (levedura manitol) a 28°C até turvamento (isto é, fase de crescimento exponencial). DNA total foi extraído de 1 mL do caldo de crescimento usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation). Uma alíquota de 2µL do extrato de DNA foi adicionado em 20µL da mistura para o PCR contendo 0,1mM dNTP, 2,5mM MgCl₂, 1µL 27F primer (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1µL 1492R primer (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT -3') (DEVEREUX; WILKINSON, 2004), 1U Taq DNA polymerase, 1x PCR buffer, e água esterilizada ultrapura. A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40s, e extensão a 72°C por 1,5 minutos; e uma extensão final a

72°C por 7 minutos. O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1%, corado com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega) e visualizado em foto documentador. A purificação do produto de PCR foi realizado com Wizard SV Gel e PCR Clean-up System (Promega Corporation) seguindo as recomendações do fabricante. Sequenciamento foi realizado com primers 27F e 1492R em um 3730 DNA Analyzer (Life Technologies in Carlsbad, California).

3.2.4 Nucleotide sequence accession numbers

As sequências de nucleotídeos deste estudo foram depositadas em GenBank sob os acessos KP126628 a KP126665.

3.2.5 Análise dos dados

O agrupamento dos morfotipos foi realizado através da construção de uma matriz binária baseada nas características morfológicas de cada morfotipo usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Jaccard (PAST 1.69 software) (HAMMER et al., 2007). Os grupos foram plotados sobre o mapa de distribuição de amostragem para uma análise exploratória da estrutura geográfica. Os resultados do sequenciamento foram visualizados e editados usando o pacote estatístico BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Sequências foram identificadas usando a ferramenta BLAST no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas com sequências relacionadas usando Muscle (HALL, 2011). O alinhamento das sequências foram checadas manualmente, editadas e submetidas a análise filogenética. Uma árvore filogenética foi construída utilizando Neighbour-joining com Kimura-2 distances e bootstrapped com 1000 pseudoreplicatas usando parâmetros do software MEGA version 6 (TAMURA et al., 2013).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Isolamento bacteriano e caracterização morfológica

Foram isolados 288 estirpes bacterianas originadas de 61 diferentes localidades. As características morfológicas predominantes foram: colônias de crescimento rápido e borda circular (99,3%); menores que 1 mm (66%); opacas (83%); puntiformes e achatadas (72%); brancas (81%); com capacidade de acidificação de meio de cultura (81%), alcalinizaram (12%) e pH neutro (7%); produtoras de pouco muco (76%) e grande quantidade de muco (15%).

Usando as características acima, os isolados bacterianos foram agrupados em 30 diferentes morfotipos (Tabela 1) com 100% de similaridade. O morfotipo 5 foi o mais comum, representando 32% das estirpes. Os 30 morfotipos foram analisados através de matriz de similaridade. De acordo com o índice de Jaccard e um dendrograma baseado no algoritmo UPGMA, utilizando o ponto de corte a 70% de similaridade foram encontrados 11 grupos distintos (Fig. 2). Os grupos 4, 5, 8, 9 e 11 apresentaram distribuição geográfica restrita à determinadas regiões dos locais de amostragem (Fig. 1).

Tabela 1. Morfotipos de rizobactérias isoladas de nódulos de bracinga (*Mimosa scabrella*).

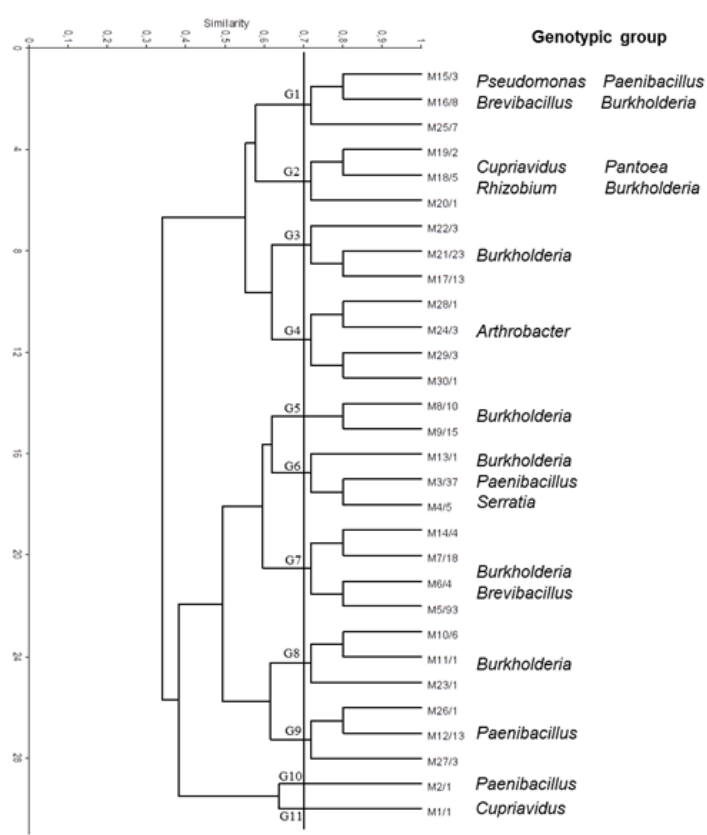
Grupos/nº de isolados	Características Morfológicas ²								
	TC	pH	DC	FC	Tr	BC	CC	El	QM
M1 / 1	R	Al	>1mm	P	T	Ir	B	A	Me
M2 / 1	R	Ac	>1mm	P	T	Ir	B	A	P
M3 / 37	R	Ac	<1mm	P	O	L	R	A	P
M4 / 5	R	Al	<1mm	P	O	L	R	A	P
M5 / 93	R	Ac	<1mm	P	O	L	B	A	P

M6 / 4	R	N	<1mm	P	O	L	B	A	P
M7 / 18	R	Al	<1mm	P	O	L	B	A	P
M8 / 10	R	Ac	<1mm	P	T	L	R	A	P
M9 / 15	R	Ac	<1mm	P	T	L	B	A	P
M10 / 6	R	Ac	>1mm	C	O	L	B	A	P
M11 / 1	R	Ac	<1mm	C	O	L	B	A	P
M12 / 13	R	Ac	>1mm	P	O	L	B	A	P
M13 / 1	R	Ac	>1mm	P	O	L	R	A	P
M14 / 4	I	Al	<1mm	P	O	L	B	A	P
M15 / 3	R	N	>1mm	C	T	L	B	C	Mu
M16 / 8	R	Ac	>1mm	C	T	L	B	C	Mu
M17 / 13	R	Ac	>1mm	C	O	L	B	C	Mu
M18 / 5	R	Ac	>1mm	C	O	L	B	C	P
M19 / 2	R	Al	>1mm	C	O	L	B	C	P
M20 / 1	R	Al	>1mm	C	T	L	B	C	P
M21 / 23	R	Ac	>1mm	C	O	L	B	C	Me
M22 / 3	R	Ac	>1mm	C	O	L	R	C	Me
M23 / 1	R	Ac	>1mm	C	O	L	B	A	Me
M24 / 3	R	N	>1mm	C	O	L	B	C	Me
M25 / 8	R	Ac	>1mm	C	T	L	B	C	Me
M26 / 1	R	Ac	>1mm	P	O	L	B	A	Me
M27 / 3	R	Ac	>1mm	P	O	L	B	C	Me
M28 / 1	I	N	>1mm	C	O	L	B	C	Me
M29 / 3	I	Al	>1mm	C	O	L	B	C	Me
M30 / 1	I	Ac	>1mm	C	O	L	B	C	Me

²TC – tempo de crescimento (R: rápido ≥ 3 dias; I: 4 a 5 dias; L: ≤ 6 dias); pH do meio (Ac: Ácido; N: Neutro; Al: Alcalino); DC – diâmetro da colônia em mm; FC – Forma da colônia (P: puntiforme; C: circular); Tr – transparência (T: transparente; O - opaca); El – Elevação (A: achatada; C:

cupular); BC – Borda da colônia (L: lisa; Ir: Irregular); CC – Cor da colônia (B:branca; R: roxa); QM – quantidade de muco (P: pouco; Me: médio; Mu: muito; A: abundante);

Figura 2. Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas dos morfotipos apresentados na tabela 1, oriundas de nódulos de bracinga. Grupos genotípicos representados pelas sequências do gene 16S rRNA avaliados para cada grupo.



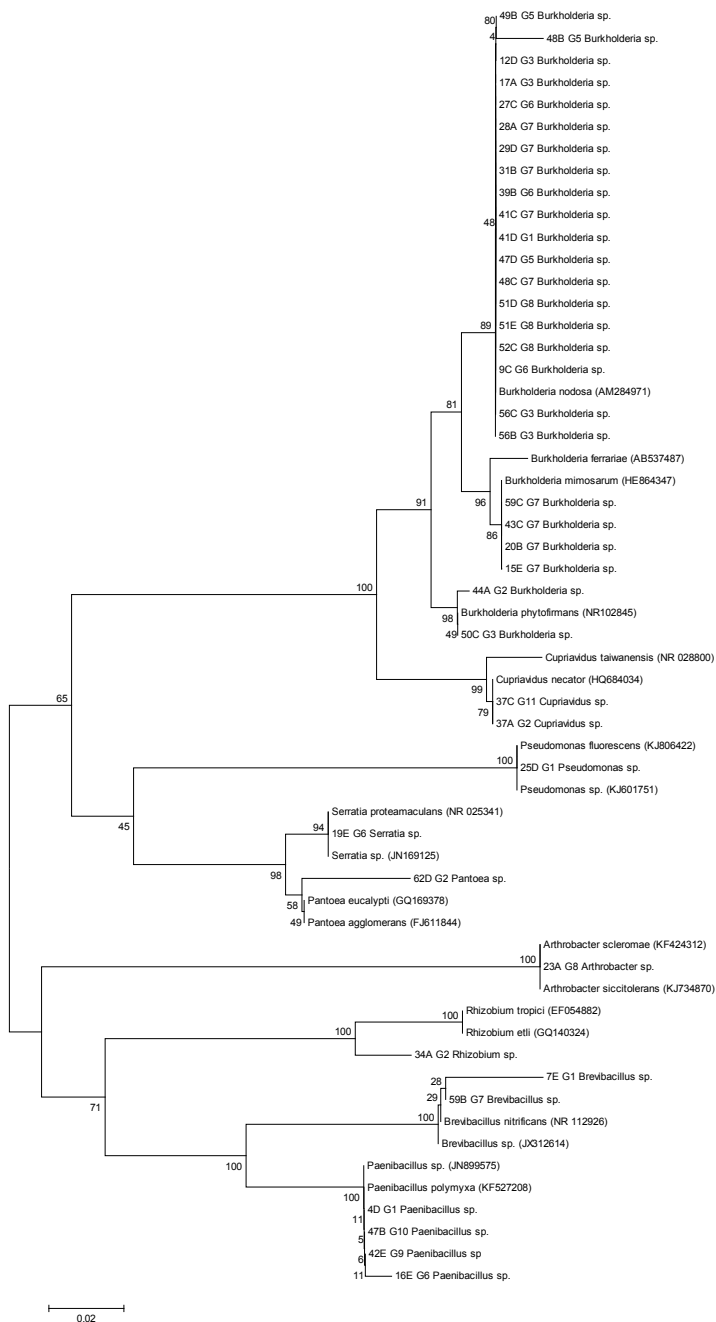
3.3.2 Análise filogenética

O comprimento total do gene 16S rRNA foi obtido de 38 estirpes selecionadas a partir da análise do dendrograma (Fig. 2). Entre as bactérias sequenciadas, *Burkholderia* foi o gênero mais comum, com 25 isolados. Com base nas semelhanças das sequências do gene 16S rRNA, a maioria das estirpes foram estreitamente relacionados com *Burkholderia nodosa* (Tabela 2, Fig. 3). No entanto, bactérias relacionadas a *B. mimosarum* e *B. phytofirmans* também foram identificadas. Duas estirpes corresponderam a bactérias pertencentes ao gênero *Cupriavidus* e um gênero *Rhizobium*.

Dez estirpes de gêneros pertencentes à bactérias associativas foram detectados habitando os nódulos. Quatro dessas bactérias pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, duas ao gênero *Brevibacillus* e uma de cada para os gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* e *Arthrobacter*.

Não houve consistência entre a diversidade bacteriana utilizando o cluster com os grupos morfológicos e a árvore filogenética. Bactérias do mesmo grupo morfológico apresentaram identificação de diferentes gêneros e bactérias em diferentes grupos morfológicos pertenceram ao mesmo gênero (Figs. 1 e 3).

Figura 3. Árvore filogenética (Neighbor-joining) baseada nas sequências do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de nódulos de *M. scabrella*, incluindo bactérias similares obtidas do Genbank. Os valores de Bootstrap foram baseadas em 1.000 replicatas. Nomes das bactérias isoladas de nódulos de *M. scabrella* são precedidas pelo seu número de acesso e identificação do grupo morfológico.



3.4. DISCUSSÃO

Este estudo empregou a análise da diversidade morfológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de *M. scabrella* de grande parte de sua área nativa de distribuição, considerando suas características fisiográficas e climáticas. Nossos resultados suportam a hipótese de que os nódulos de *M. scabrella* contém maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias associativas. Por outro lado, a diversidade morfológica das bactérias não foi consistente com a diversidade genética realizada através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

O sequenciamento do gene 16S rRNA amplificou, aproximadamente, 1500 pb e confirmou que *Burkholderia* é o gênero de bactéria fixadora de nitrogênio mais comum nos nódulos de *M. scabrella*. Pela primeira vez, relata-se que bactérias do gênero *Cupriavidus* formam nódulos nesta espécie, que juntamente com *Rhizobium*, indica que *M. scabrella* pode ser nodulada por diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, pelo menos não simultaneamente. Esta diversidade é maior que a encontrada em trabalhos anteriores (CHEN et al., 2007; LAMMEL et al., 2013). *Cupriavidus* tem sido relatado como uma importante bactéria fixadora de nitrogênio em outras espécies de *Mimosa* (BARRETT; PARKER 2006; LIU et al., 2011; MISHRA et al., 2012; ADEMAR et al., 2012). No entanto, identificamos apenas duas estirpes desse gênero, em apenas um local de amostragem. Somente uma estirpe de *Rhizobium* foi identificada nesse trabalho e, embora não seja comum o isolamento de α -Proteobacteria em nódulos de espécies de *Mimosa*, esse resultado corrobora aqueles obtidos por Ehrhardt-Brocardo (2013), que também identificou uma estirpe de *Rhizobium* nodulando *M. scabrella*.

Estirpes de *Burkholderia* tem sido isoladas como bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes partes do

mundo; Costa Rica (BARRETT; PARKER 2006), Guiana Francesa (MISHRA et al., 2012), Brasil (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008; BONTEMPS et al., 2010; SHEU et al., 2012), China (LIU et al., 2011), Índia (VERMA; CHOWDHURY; TRIPATHI, 2004), Taiwan e Venezuela (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2006). No entanto, *Burkholderia nodosa* parece ser mais restrita em relação aos hospedeiros vegetais. Esta espécie foi isolada e descrita originalmente habitando os nódulos de *M. scabrella* e *M. bimucronata* (CHEN et al., 2007) e posteriormente em diferentes espécies de *Mimosa* (BONTEMPS et al., 2010). Recentemente, *B. nodosa* foi também isolada em *Piptadenia* (BOURNAUD et al., 2013). Neste estudo, a grande maioria das estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram fortemente relacionadas à *B. nodosa* quando comparado as sequências do gene 16S rRNA através do GenBank (tabela 2 e figura 3).

Tabela 2. Resultados da busca no GenBank das sequências do gene 16S rRNA a partir das estirpes isoladas de nódulos de *M. scabrella*.

Gênero identificado	Número de isolados	número de acesso no GenBank	Espécie mais próxima (número de acesso), identidade máxima
<i>Burkholderia</i>	19	KP126630	<i>Burkholderia nodosa</i> (AM28971 and AY773192) 99%
		KP126631	
		KP126634	
		KP126639 to	
		KP126642	
		KP126646 to	
		KP126648	
		KP126653 to	
		KP126656	
<i>Burkholderia</i>	2	KP126658 to	<i>Burkholderia mimosarum</i> (HE864347) 99%
		KP126662	
<i>Burkholderia</i>	1	KP126632	<i>Burkholderia mimosarum</i>
		KP126664	(HE864347) 99%
<i>Burkholderia</i>	1	KP126657	<i>Burkholderia phytofirmans</i>

			(NR102845) 99%
<i>Burkholderia</i>	3	KP126650	<i>Burkholderia</i> sp.
		KP126651	(GQ249215 and
		KP126636	FJ528268)99%
<i>Rhizobium</i>	1	KP126643	<i>Rhizobium</i> sp. (KC853173)
			95%
<i>Cupriavidus</i>	2	KP126644	<i>Cupriavidus necator</i>
		KP126645	(HQ684034) 99%
		KP126631	
		KP126633	<i>Paenibacillus</i> sp.
<i>Paenibacillus</i>	4	KP126649	(JN899575); <i>P. polymyxa</i>
		KP126652	(KF527208) 99%
<i>Pseudomonas</i>	1	KP126638	<i>Pseudomonas</i> sp.
			(KJ601751) 99%
<i>Brevibacillus</i>	2	KP126629	<i>Brevibacillus</i> sp.
		KP126663	(JX312614) 99% <i>B.</i>
			<i>nitrificans</i> (NR_112926)
			98%
<i>Arthrobacter</i>	1	KP126637	<i>Arthrobacter siccitolerans</i>
			(KJ734870) 99%
<i>Serratia</i>	1	KP126635	<i>Serratia proteamaculans</i>
			(NR025341) 99%
<i>Pantoea</i>	1	KP126665	<i>Pantoea agglomerans</i>
			(FJ611844) 95%

Dentre as estirpes analisadas, isolaram-se e identificaram-se bactérias associativas não-nodulantes ocorrendo dentro dos nódulos de *M. scabrella*. Embora os gêneros *Pseudomonas* e *Pantoea* já tenham sido relatados previamente no interior dos nódulos de espécies *Mimosa* (LAMMEL et al, 2013;. EHRHARDT-BROCARD, 2013), encontraram-se, pela primeira vez, bactérias pertencentes aos gêneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Arthrobacter* e *Serratia* em plantas de *Mimosa*. Estes gêneros tem sido isolados de nódulos de diferentes leguminosas (ZAKHIA et al., 2006; LI et al., 2008; STAJKOVIĆ et al., 2009; PALANIAPPAN et al., 2010; HOQUE; BROADHURST; THRALL, 2011; DENG et al., 2011), mas nunca em *Mimosa*. As funções ecológicas

destas bactérias ainda não são bem entendidas. Wang et al. (2006) descreveu bactérias associativas ocupando nódulos formados por bactérias formadoras de nódulos sem afetar o crescimento da planta e nodulação. Em contrapartida, algumas bactérias destes gêneros têm sido relatadas como promotores de crescimento de plantas (RASHEDUL et al., 2009), agentes de supressão de doenças (COMPANT et al., 2005) e como capazes de melhorar a tolerância da planta contra stress ambiental. (FIGUEIREDO et al., 2008; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009). Trabalhos futuros poderão investigar o papel das bactérias associativas em *M. scabrella* e outras espécies de *Mimosa*.

Neste trabalho encontrou-se diversidade morfológica considerável nos nódulos de *M. scabrella*, o qual foi confirmado pelos resultados obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. No entanto, quando comparado o agrupamento morfológico e a análise filogenética das estirpes, nenhuma correspondência foi encontrada entre eles. Em alguns casos, o mesmo grupo morfológico contém diferentes grupos genotípicos (Figura 2). Estes resultados foram consistentes com os encontrados por Lammel et al. (2013) e demonstraram que a caracterização morfológica não é uma abordagem confiável para a construção de grupos geneticamente identificáveis. No entanto, essa abordagem pode ser útil como primeiro passo no processo de isolamento e análise da diversidade bacteriana. Curiosamente, alguns grupos morfológicos apresentaram distribuição restrita à determinada região geográfica. Por exemplo, o grupo 5, com 25 estirpes, concentrou-se na região do planalto (Figura 1), o grupo 9, com 17 estirpes, foi restrito à região Oeste, e os morfotipos dos grupos 4 e 6 foram restritos à região de transição com a Floresta Ombrófila Densa. Essa observação, juntamente com a diversidade de bactérias encontradas nos nódulos de *M. scabrella* pode ter sido resultado do esforço amostral realizado através de uma ampla faixa geográfica de sua ocorrência natural, quando comparado

a estudos anteriores para esta espécie. Este fato levanta a questão sobre a capacidade das bactérias fixadoras de nitrogênio em *M. scabrella* poderem apresentar o mesmo efeito em plantas de diferentes acessos. No entanto, mais pesquisas sobre a distribuição espacial e adaptação local das comunidades bacterianas associadas com *M. scabrella* é necessária para determinar o potencial de estruturação geográfica e o quanto isso deve ser importante para o crescimento e desenvolvimento da *M. scabrella*. Tendo essa variabilidade bacteriana em consideração, juntamente com as possíveis variabilidades genéticas da bracatinga, que foi controlada no presente estudo (ou seja, todas as sementes originaram-se do mesmo local), este pode ser um importante ponto de vista a ser aplicado em ecologia.

3.5 CONCLUSÃO

Nossos dados apresentaram que tanto α -rhizobia e diferentes β - rhizobia foram isoladas de *M. scabrella* do interior de nódulos e que diversas bactérias associativas também estão presentes nos nódulos. Além disso, identificou-se *Burkholderia nodosa* como a espécie mais relacionada com bactérias fixadoras de nitrogênio nesta espécie. O sequenciamento do gene 16S rRNA demonstrou que a caracterização morfológica não é uma boa ferramenta de separação de espécies.

3.6 REFERÊNCIAS

ADEMAR, P. et al. Symbiotic efficiency of *Cupriavidus necator* strains tolerant to zinc, cadmium, copper and lead. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 85–95, 2012.

AUMOND, J. J.; LOCH, C.; e COMIN, J. J. Systemic Approach and Use of Models for Rehabilitation of Degraded Areas. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, p. 1099–1118, 2012.

BARRETT, C. F. e PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium sp.* Nodule Bacteria on two *Mimosa spp.* in Costa Rica. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1198–1206, 2006.

BARTH, O. M. Melissopalynology in brazil: a review of pollen analysis of honeys , propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 342–350, 2004.

BONTEMPS, C. et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44–52, 2010.

BOURNAUD, C. et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). **PloS One** 8. 2013.

CHEN, W. et al. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266–7272, 2003

CHEN, Wen-Ming et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-

nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847–51, 2006.

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2007.

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 9, p. 2174–2179, 2008.

COMPANT, Stéphane et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

DAHMER, Nair et al. “Bracatinga”(*Mimosa scabrella* Bentham), a multipurpose tree growing in Southern Brazil: chromosome number and genetic variation. **Genetic resources and crop evolution**, v. 60, n. 1, p. 377-383, 2013.

DENG, Z. S. et al. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. **FEMS microbiology Ecology**, v. 76, n. 3, p. 463–475, 2011.

DEVEREUX, Richard; WILLIS, Stephanie G. Amplification of ribosomal RNA sequences. In: **Molecular microbial ecology manual**. Springer Netherlands, 2 ed. p. 277-287, 2004.

EHRHARDT-BROCARD, N. C. M. **Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de diazotróficos isolados de bracinga**. 2013. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, 2013.

ELLIOTT, Geoffrey N. et al. *Burkholderia spp.* are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762–778, 2009.

FERREIRA, Paula Iaschitzki et al. Espécies potenciais para recuperação de áreas de preservação permanente no Planalto Catarinense. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2013.

FIGUEIREDO, Márcia VB et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 182–188, 2008.

GYANESHWAR, Prasad et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 1999.

HALL, B.G. **Phylogenetic trees made easy**: a how-to manual. Sinauer, Massachusetts. 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST - Palaeontological STatistics**, ver. 1.69. 2007.

HOQUE, Mohammad S.; BROADHURST, Linda M.; THRALL, Peter H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 2, p. 299-309, 2011.

LAMMEL, Daniel R. et al. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LI, Ji Hong et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LIU, X.Y. et al. Phylogenetic relationships and diversity of β -rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 61, p. 334-42, 2011.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RECH, T.D.; TORESAN, L. (Orgs.), **Bracatinga: cultivo, manejo e usos da espécie**. Florianópolis: Epagri, 2014.

MARTINS, L.M.V. et al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”**. Embrapa Agrobiologia, dez, 1997. (Comunicado Técnico. n. 19, p. 1-14).

MISHRA, Ravi PN et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.

MOREIRA, Priscila Ambrósio et al. Genetic diversity and mating system of bracinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern Brazil. **Agroforestry systems**, v. 83, n. 2, p. 245-256, 2011.

MÜLLER, J.J.V. **Levantamento Socioambiental do Inventário Florestal**. Florianópolis: Epagri, 2011.

PALANIAPPAN, Pitchai et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza sp.* **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 8, p. 807-816, 2010.

PARKER, Matthew A.; WURTZ, Anna K.; PAYNTER, Quentin. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: a comparative analysis. **Biology Invasions**. v. 9, p. 127–138, 2007.

RASHEDUL, I. et al. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Free-Living Diazotrophic Bacteria and Their Inoculation Effects on Growth and Nitrogen Uptake of Crop Plants. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, p. 1213–1222, 2009.

SHEU, Shih-Yi et al. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp.* native to north-east Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt 9, p. 2272-2278, 2012.

STAJKOVIĆ, O. et al. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica Serbica**, v. 33, n. 1, p. 107–114, 2009.

STEENBOCK, Walter. et al. Ocorrência da bracatinga (*Mimosa scabrella* benth.) em bracatingais manejados e em florestas secundárias na região do planalto catarinense. **Revista Árvore**, v. 35, p. 845–857, 2011.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

VANDAMME, Peter; COENYE, Tom. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

VERMA, Subhash Chandra; CHOWDHURY, Soumitra Paul; TRIPATHI, Anil Kumar. Phylogeny based on 16S rDNA and nifH sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 5, p. 313-322, 2004.

VINCENT, J., **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, p. 21–23. 1970.

WANG, Ling Ling et al. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbial ecology**, v. 52, n. 3, p. 436-443, 2006.

YANG, Jungwook; KLOEPPER, Joseph W.; RYU, Choong-Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in plant science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

ZAKHIA, Frédéric et al. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. **Microbial ecology**, v. 51, n. 3, p. 375-393, 2006.

4 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM BRACATINGA (*Mimosa scabrella*) E TESTE EM DIFERENTES ACESSOS DE *Mimosa scabrella*.

RESUMO

A fixação biológica de N_2 é um processo reconhecidamente importante para a incorporação desse elemento para as plantas, principalmente nas leguminosas. Diversos gêneros bacterianos estão envolvidos nesse processo e normalmente ocorre especificidade entre a planta e a bactéria envolvida. Para *M. scabrella*, importante leguminosa arborea que ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento da floresta ombrófila mista, bactérias do gênero *Burkholderia* são as principais fixadoras de N_2 identificadas, embora outros gêneros já tenham sido descritos em nódulos dessa espécie. Neste trabalho testou-se a eficiência e eficácia simbiótica de vinte e cinco estirpes de *Burkholderia*, duas de *Cupriavidus* e um *Rhizobium*. Além disso, outro experimento avaliou a variação da eficiência simbiótica de duas bactérias em três acessos de *M. scabrella*. Os dois experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, em condições de temperatura e luminosidades controladas, com cinco repetições para cada tratamento. As estirpes do gênero *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Cupriavidus* foram capazes de formar nódulos em *M. scabrella*. No entanto, as bactérias do gênero *Cupriavidus* não fixaram N_2 para a planta. Em contrapartida, algumas bactérias do gênero *Burkholderia* mostraram capacidade de fixar todo o N_2 necessário para o metabolismo da planta, embora os resultados tenham grande variação em relação à estirpe de *Burkholderia* utilizada. Além disso, o acesso de *M. scabrella* pode influenciar na eficiência da bactéria fixadora de nitrogênio.

Palavras-chave: Simbiose; Fixação de nitrogênio; eficácia simbiótica.

ABSTRACT

Nitrogen fixation is a process accepted as essential to uptakes this element for plants, mainly in legumes. Different bacterial genera are involved in this process and normally are host specificity. For *M. scabrella*, an important leguminous tree, pionner in the early stages of Mixed Ombrophilous Forest, genus *Burkholderia* are the main identified N₂ fixing bacteria, although other genera have been described nodulating this species. In the present work, we evaluated the symbiotic efficiency and effectiveness of twenty-five *Burkholderia* strains, two *Cupriavidus* and one *Rhizobium*. In addition, another experiment assessed the symbiotic efficiency variation from two nitrogen fixing bacteria in three *M. scabrella* progeny. The experiments were conducted both in a growth chamber at temperatures and luminosity controlled with five replicates for each treatment. The *Burkholderia*, *Rhizobium* and *Cupriavidus* strains were able to form nodules in *M. scabrella*. However, the two *Cupriavidus* strains formed small non N₂ fixing nodules. In contrast, certain *Burkholderia* strains had the potential to fix all the N required by their host, although the results have had a wide variation in relation to the *Burkholderia* strains used. In addition, the progeny of *M. scabrella* may influence in the N₂ fixation ability of the bacteria.

Keywords:. Symbiosis; Nitrogen fixation; Symbiotic effectiveness.

4.1 INTRODUÇÃO

Bracatinga (*Mimosa scabrella*) é uma leguminosa arbórea que ocorre naturalmente na Floresta de Araucária. É um importante recurso para os pequenos agricultores do sul do Brasil. Plantas vivas são essenciais para a produção de um mel ou melato de alto valor, típico do sul do Brasil (BARTH, 2004) e são usadas na recuperação florestal (FERREIRA et al., 2013; AUMOND; LOCH; COMIM, 2012). A madeira pode ser utilizada na construção civil, mas, geralmente, é usada como fonte de energia (MAZUCHOWSKI et al., 2014; MÜLLER, 2011). *Mimosa scabrella* é uma espécie pioneira dos estágios iniciais de sucessão ecológica e domina comunidades sob perturbação. Nessas áreas ela pode formar populações com alta densidade dessa planta, chamado popularmente de bracatingais (MAZUCHOWSKI et al., 2014; MOREIRA et al., 2011).

Como outras espécies de leguminosas, *M. scabrella* forma associações com bactérias fixadoras de nitrogênio em suas raízes (GYANESHWAR et al., 2011). No entanto, apesar de relatos de que diferentes bactérias fixadoras de N₂ e associativas ocorrerem em nódulos de *Mimosa* sp., pouco se sabe sobre essa diversidade bacteriana. O gênero *Mimosa* pode associar-se com diferentes α - e β - subclasses de Proteobacteria (CHEN et al., 2003). Entretanto, *Burkholderia* sp. tem sido a principal bactéria identificada em nódulos de *Mimosa pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* e *M. scabrella* (VANDAMME; COENYE 2004; CHEN et al., 2006; LAMMEL et al., 2013). Além disso, cepas dos gêneros *Cupriavidus* e *Rhizobium* também foram identificadas como nodulíferas em diversas espécies de *Mimosa* (BARRETT; PARKER, 2006; ELLIOTT et al., 2009) e *Pseudomonas* e *Pantoea* como bactérias associativas presentes nos nódulos de *M. scabrella* (EHRHARDT-BROCARD, 2013; LAMMEL et al., 2013).

Estudos de eficácia simbiótica na fixação de nitrogênio (isto é, a capacidade de certa bactéria fixar o nitrogênio para a planta comparado ao controle não inoculado e sem restrições de N_2) em espécies do gênero *Mimosa* são escassos e não tem levado em consideração a diversidade de bactérias que se associam com esses hospedeiros. Esta informação é importante para o desenvolvimento de melhores abordagens de gestão voltada para o cultivo dessas espécies com fins econômicos. Faria e Uchôas (2007) relataram a inoculação de *M. scabrella* com cinco estirpes de bactérias fixadoras de N_2 isoladas de nódulos dessa espécie, posteriormente identificadas como *Burkholderia* sp., que resultou em 40% de eficácia para a fixação de N_2 . No entanto, a mesma abordagem com bactérias fixadoras de N_2 de *M. caesalpiniiifolia* e *M. acutistipula* resultou em eficácia muito maior nessas espécies. Mais recentemente, Lammel et al. (2013) relatou 53% de eficácia quando cresceu *M. scabrella* com quatro estirpes distintas de *Burkholderia*. Tomados em conjunto, esses estudos sugerem que a diversidade de bactérias presentes nos nódulos de *M. scabrella* pode ser muito maior do que a atualmente conhecida e que a eficácia na fixação de N_2 , pode variar amplamente, mesmo entre estirpes estreitamente relacionadas.

O objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência simbiótica de diferentes estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *M. scabrella* e avaliar o crescimento de diferentes acessos inoculados com a mesma bactéria fixadora de nitrogênio. Dessa forma, as hipóteses desse trabalho são: 1) Existe uma grande variação na eficácia da fixação biológica de nitrogênio, incluindo estirpes capazes de fixar a mesma quantidade de N_2 em comparação com o controle fertilizado; 2) Bactérias do gênero *Cupriavidus* e *Rhizobium* também são capazes de nodular e fixar N_2 para a planta; 3) Diferentes acessos de *M. scabrella* possuem eficiência simbiótica distintas quando inoculadas com a mesma bactéria.

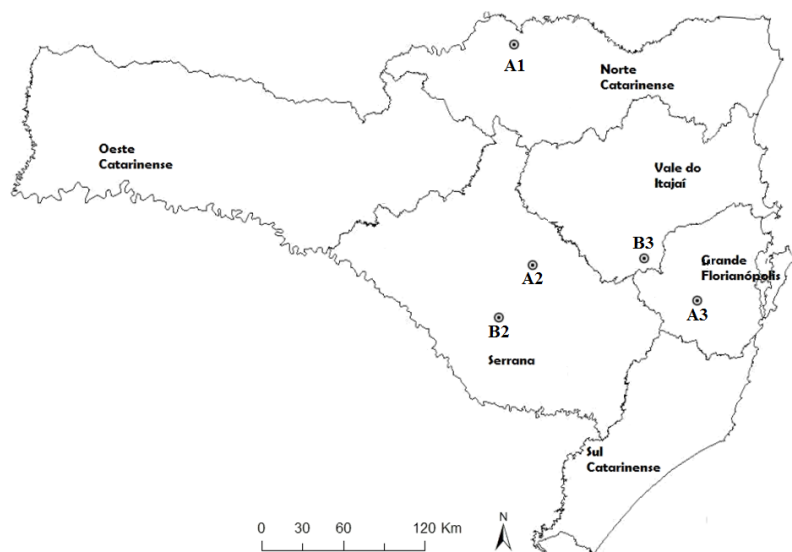
4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Origem das bactérias e sementes

As estirpes bacterianas utilizadas nesse experimento foram isoladas de nódulos de *M. scabrella* coletadas de diferentes localidades no estado de Santa Catarina (Fig. 1) e identificadas a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (ver capítulo 3). Para o experimento I foram selecionadas vinte e oito estirpes identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA com capacidade de formar nódulos em plantas leguminosas (GYANESHWAR et al. 2011), ou seja, bactérias do gênero *Burkholderia*, *Cupriavidus*, e *Rhizobium*. Para o experimento II, duas estirpes do gênero *Burkholderia*, com eficácia simbiótica confirmada, foram selecionadas de biomas distintos, conforme a fig. 4.

As sementes de *M. scabrella* utilizadas para o experimento I foram coletadas de única matriz localizada no município de Urupema/SC, sob as coordenadas geográficas 27°57'41.75"S e 49°50'40.90"O e armazenadas a 4°C. Para o experimento II, as sementes foram coletadas de três regiões distintas do estado de Santa Catarina, conforme o mapa (Fig. 4). Inicialmente, as sementes foram esterilizadas superficialmente com etanol 96% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 5 minutos e lavadas com água destilada. A quebra de dormência das sementes foi realizada por imersão em água à 80°C durante cinco minutos, deixando-as em repouso durante 18 horas. Em seguida, as sementes foram pré-germinadas em folhas de papel absorvente Gear Box®, umedecidas com água destilada esterilizada, em câmara do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 25°C, até a protrusão da radícula alcançar 2 cm de comprimento.

Figura 4. Mapa apresentando os locais de coleta de sementes A1 (26°16'3.80"S / 50°45'41.73"O), A2 (27°30'13.47"S / 50°07'43.50"O) e A3 (27°41'48.22"S / 49°02'56.53"O) e também os locais de coleta de onde as bactérias fixadoras de N₂ foram isoladas, B2 (27°51'20.06"S / 50°21'43.06"O) e B3 (27°31'44.82"S / 49°28'52.42"O).



4.2.2 Experimento I: Eficiência simbiótica de rizobactérias isoladas de nódulos de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)

A avaliação da eficiência simbiótica das vinte e oito bactérias foi realizada em câmara de crescimento, localizada no laboratório de Biotecnologia da Estação Experimental de Lages, da EPAGRI.

As sementes pré-germinadas foram transferidas e cultivadas em vasos com capacidade para 700 mL, preenchidos com substrato estéril (areia e vermiculita, 1:1, v/v) e alocadas na câmara de crescimento com temperatura constante de 28°C e fotoperíodo de 14 horas. O experimento foi conduzido em

delineamento completamente casualizado, com cinco repetições para cada isolado bacteriano e nos tratamentos controle: com fertilização nitrogenada (50 e 100 mg de nitrato de amônio parcelado semanalmente); e sem fertilização nitrogenada. Solução de Somasegaran & Hoben (HUNGRIA; ARAUJO, 1994) foi adicionada a cada sete dias em todos os tratamentos. Todos os vasos foram irrigados diariamente com água destilada. Os vasos atribuídos às estirpes de teste foram inoculados com 1mL de suspensão bacteriana após incubação à 28°C em agitador de bancada com cada bactéria isoladamente, contendo aproximadamente 10^9 UFC mL⁻¹ (HUNGRIA; ARAUJO, 1994). A inoculação foi realizada sete dias após o transplante das sementes pré-germinadas a fim de permitir seu estabelecimento no substrato.

4.2.3 Experimento II: Eficiência simbiótica de estirpes bacterianas fixadoras de N₂ em diferentes acessos de *Mimosa scabrella*.

Para o experimento II, as duas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) do gênero *Burkholderia* foram inoculadas em sementes pré-germinadas de *M. scabrella* de três localidades diferentes do estado de Santa Catarina (ver 4.2.1). Os procedimentos para a esterilização, quebra de dormência e pré-germinação foram idênticos àqueles descritos no experimento I.

As sementes pré-germinadas foram transferidas e cultivadas em vasos contendo 1,8 L de substrato estéril (areia e vermiculita, 1:1, v/v) e alocadas em câmara de crescimento com temperatura constante de 28°C e fotoperíodo de 14 horas. O experimento foi conduzido em delineamento fatorial, com 2 estirpes bacterianas e 3 acessos, com cinco repetições para cada tratamento. Um controle sem fertilização nitrogenada e outro com (100 mg de nitrato de amônio parcelado semanalmente) foram adicionados para cada progênie testada, a fim de testar a eficiência e eficácia simbiótica de cada BFN.

Solução de Somasegaran & Hoben (HUNGRIA; ARAUJO, 1994) foi adicionada a cada sete dias em todos os tratamentos.

4.2.4 Colheita e variáveis analisadas

As plantas foram colhidas depois de 90 dias de crescimento. Foi determinado o comprimento da planta, massa da matéria seca da parte aérea, número de nódulos e massa da matéria seca de nódulos. A parte aérea da planta e os nódulos foram secos em estufa de circulação forçada à 60°C até obtenção da massa constante e então pesados. A concentração de N na planta foi determinada conforme Tedesco et al., (1985) e usada para calcular o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) multiplicando a concentração de N pela massa seca da parte aérea. Com o resultado da MSPA calculou-se a eficiência relativa segundo a fórmula: $ER = (ANPA \text{ inoculada} / ANPA \text{ controle sem N}) \times 100$ e a eficácia através da fórmula $EF = (ANPA \text{ inoculada} / ANPA \text{ controle com N}) \times 100$. Para o cálculo foi utilizado o controle que recebeu 100mg de N₂, pois ambos o controles fertilizados com N (50mg e 100mg) obtiveram os mesmos resultados (FARIA e UCHÔAS, 2007).

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando as diferenças foram significativas, o teste de média Scott-Knott ($p > 0,05$) para o primeiro experimento e Tukey ($p > 0,05$) para o segundo foram aplicados. A transformação Box-Cox foi utilizada, quando necessário, a fim de estabilizar a variância residual (SAKIA, 1992). Os procedimentos estatísticos foram executados usando o programa Statistica (StatSoft, 2013).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 28 estirpes bacteriana utilizadas foram capazes de formar nódulos em *M. scabrella* (Tab. 3). As estirpes de

Burkholderia identificadas como 48c, 48b, 17a e 9c fixaram quantidades similares de N_2 comparadas ao controle não inoculado, com nitrogênio adicionado. Apesar de serem capazes de formar nódulos, embora relativamente pequenos quando comparados com aqueles formados por outras bactérias, estirpes de *Cupriavidus* foram incapazes de fixar N_2 (Tab. 3). A bactéria pertencente ao gênero *Rhizobium* testada em *M. scabrella* mostrou boa nodulação e eficácia na fixação de N_2 .

Bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram predominantes entre os isolados. No entanto, sua eficácia na fixação de N_2 foi altamente variável entre as estirpes. A estirpe de *Burkholderia* mais eficaz aumentou a altura da planta mais de 3 vezes e o acúmulo de N mais de 30 vezes quando comparado ao controle não-inoculado e não fertilizado (Fig. 5).

Figura 5. *Mimosa scabrella* cultivada em condições axênicas inoculada com rizobactéria nodulífera.



Tabela 3. Nodulação e eficácia simbiótica de estirpes bacterianas inoculadas em *M. scabrella*. As médias em cada coluna que partilham a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Scott-Knott $p < 0.05$).

Bactéria	Grupo Genotípico	Alt * (cm)	MSPA (g plant ⁻¹)	NN	MSN (g plant ⁻¹)	ANPA (mg plant ⁻¹)	Eficácia (%)
Controle N		24,9 a	1,7 a	0	0	27,9 a	
48c G7	<i>Burkholderia</i>	25,1 a	2,4 a	196,2 a	0,22 a	42,4 a	152
17a G3	<i>Burkholderia</i>	22,9 a	1,6 a	167,4 a	0,10 a	32,3 a	116
48b G5	<i>Burkholderia</i>	22,9 a	2,1 a	140,4 a	0,14 a	37,6 a	135
9c G6	<i>Burkholderia</i>	20,7 a	1,7 a	100,3 a	0,11 a	28,9 a	104
51e G8	<i>Burkholderia</i>	20,4 a	1,4 a	51,8 a	0,11 a	23,2 a	83
56b G3	<i>Burkholderia</i>	24,7 a	1,5 a	105,3 a	0,09 a	20,0 b	72
34a G2	<i>Rhizobium</i>	18,6 b	1,5 a	49,6 b	0,12 a	20,8 a	75
29d G7	<i>Burkholderia</i>	19,4 a	1,0 b	78,4 a	0,10 a	16,1 b	58
52c G8	<i>Burkholderia</i>	18,4 a	0,9 b	74,6 a	0,08 b	17,9 b	64
41d G1	<i>Burkholderia</i>	16,5 b	0,8 b	101,8 a	0,05 b	12,7 b	46
51d G8	<i>Burkholderia</i>	16,0 b	0,6 b	60,2 a	0,03 c	10,1 b	36
44a G2	<i>Burkholderia</i>	15,9 b	0,9 b	83,4 a	0,09 a	14,1 b	51
39b G6	<i>Burkholderia</i>	15,1 b	0,6 b	101,2 a	0,06 b	8,3 b	30

12d G3	<i>Burkholderia</i>	15,2 b	0,7 b	75,3 a	0,04 b	13,8 b	50
20b G7	<i>Burkholderia</i>	15,6 b	0,6 b	71,8 a	0,04 b	10,5 b	38
43c G7	<i>Burkholderia</i>	13,9 b	0,7 b	85,1 a	0,09 a	9,4 b	34
47d G5	<i>Burkholderia</i>	13,8 b	0,8 b	62,73 a	0,07 b	15,0 b	54
15e G7	<i>Burkholderia</i>	13,6 b	0,6 b	70 a	0,07 b	11,4 b	41
31B G7	<i>Burkholderia</i>	13,5 c	0,5 c	62,8 a	0,04 c	8,0 c	29
59c G7	<i>Burkholderia</i>	11,3 c	0,4 c	53,6 a	0,06 b	5,5 c	20
28a G7	<i>Burkholderia</i>	11,3 c	0,4 c	33,4 b	0,03 c	6,4 c	23
27c G6	<i>Burkholderia</i>	9,9 c	0,3 c	27,2 b	0,01 d	4,8 c	17
56c G3	<i>Burkholderia</i>	10,4 c	0,3 c	37,2 b	0,01 d	4,4 c	16
41c G7	<i>Burkholderia</i>	9,2 c	0,2 d	18,2 b	0,01 d	3,4 c	12
37a G2	<i>Cupriavidus</i>	6,8 d	0,1 d	18,6 b	0,01 d	1,3 d	5
49b G5	<i>Burkholderia</i>	7,1 d	0,1 d	18,6 b	0,01 d	2,5 c	9
50c G3	<i>Burkholderia</i>	6,5 d	0,1 d	31,4 b	0,01 d	1,1 d	4
37c G11	<i>Cupriavidus</i>	6,2 d	0,1 d	29,2 b	0,01 d	0,8 d	3
Controle (-)		6,8 d	0,04 d	0	0	0,7 d	

*Altura (ALT); massa da matéria seca da parte aérea (MSPA); número de nódulos (NN); massa da matéria seca de nódulos (MSN); acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficácia de bractatinga (*Mimosa scabrella*) inoculada com rizobactérias.

Em relação ao experimento com os diferentes acessos de *M. scabrella*, houve diferença estatística entre as plantas de diferentes áreas, principalmente as plantas da área 3 (A3), que apresentaram menor massa seca da parte aérea (MSPA) em relação às outras (Tab. 4). As bactérias fixadoras de nitrogênio (B1 e B2) demonstraram eficiência simbiótica quando inoculadas nas plantas, produzindo maior MSPA em relação aos seus respectivos controles sem nitrogênio, com exceção para a progênie A3, onde nenhuma das bactérias utilizadas foi capaz de aumentar o crescimento da planta. Não houve interação das BFN com as diferentes progênies testadas, sendo que os resultados para a bactéria B2 não foram diferentes dos resultados para a bactéria B3. A eficácia simbiótica da B2 foi de 61% e 64% para plantas da área 1 e área 2, respectivamente e para a B3 foi de 68% e 43%, valores abaixo dos encontrados no experimento I, que foram de 104% para a B2 e 83% para a B3, quando inoculadas em sementes oriundas de Urupema.

Tabela 4. Número de nódulos, massa da matéria seca de nódulos e da parte aérea de plantas de *M. scabrella* oriundas de diferentes acessos (A1, A2 e A3) e inoculadas com bactérias fixadoras de N₂ (B2 e B3).

Tratamento	Controle (-N)	B2	B3	Controle (+N)
Número de nódulos				
A1	-	70 aA	54,6 aA	-
A2	-	56,8 aA	36,3 aA	-
A3	-	22,2 aA	20,8 aA	-
Massa matéria seca de nódulos (mg)				
A1	-	41,9 abA	72,8aA	-
A2	-	56,8 aA	36,3abA	-
A3	-	22,2 bA	20,8bA	-
Massa matéria seca da parte aérea (g)				
A1	0,4 bC	1,1 aB	1,2 aB	1,7 aA
A2	0,8 aC	1,4 aB	0,9 aC	2,2 aA
A3	0,4 bB	0,4 bB	0,3 bB	2,0 aA

Valores seguidos da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao contrário da MSPA, que foi diferente para as plantas da área 3, o número de nódulos (NN) não apresentaram mudanças significativas com a inoculação das BFN e não houve interação entre os resultados. No entanto, os resultados da massa seca de nódulos (MSN) foram estatisticamente menores para os nódulos obtidos das raízes de plantas da área 3, em relação aos nódulos de plantas da área 2, no caso da B2 e menores em relação à área 1, no caso da B3.

4.4 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a eficiência simbiótica de um grande número de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes gêneros para *M. scabrella*. Os resultados suportam a

hipótese de que existe uma variação na eficácia da fixação biológica de nitrogênio, mesmo entre bactérias semelhantes geneticamente. Pela primeira vez encontraram-se bactérias capazes de fixar todo o nitrogênio requerido pelo hospedeiro (ou seja, 100% de eficácia). No entanto, nossos resultados mostraram que estirpes de BFN do gênero *Cupriavidus*, embora capazes de formar nódulos, não apresentam eficiência simbiótica para a *M. scabrella*. Além disso, os dados suportam a hipótese de que diferentes acessos de *M. scabrella* podem influenciar na capacidade de crescimento da bracatinga quando inoculadas com a mesma bactéria, pois as BFN foram eficientes para as plantas das áreas 1 e 2, mas não para as plantas da área 3.

O gênero *Burkholderia* é o mais comum encontrado em nódulos de *M. scabrella*. No entanto, relata-se a formação de nódulos por bactérias do gênero *Cupriavidus* nessa espécie, o qual juntamente com a estirpe do gênero *Rhizobium*, indica que *M. scabrella* pode ser nodulada por diferentes gêneros de bactérias fixadoras de N_2 , pelo menos não simultaneamente. *Cupriavidus* já foi descrito como importante fixadora de N_2 em outras espécies de *Mimosa* (BARRETT; PARKER, 2006; LIU et al., 2011; MISHRA et al., 2012; ADEMAR et al., 2012). No entanto, as duas estirpes testadas neste experimento formaram nódulos pequenos e incapazes de fixar N_2 , com resultados semelhantes ao controle sem fertilização nitrogenada. Em relação à bactéria do gênero *Rhizobium*, ela foi isolada, primeiramente, em nódulos desta espécie pelo trabalho de Ehrhardt-Brocardo (2013), mas que não testou sua capacidade de nodulação. Neste trabalho, a estirpe de *Rhizobium* foi capaz de formar nódulos em raízes de *M. scabrella* e obteve eficácia de 75% (FARIA E UCHÔAS, 2007; LAMMEL et al., 2013).

Muitas bactérias do gênero *Burkholderia* obtiveram resultados estatisticamente iguais ao controle fertilizado com nitrogênio. Estes dados demonstraram que certas estirpes de *Burkholderia* tem o potencial de estimular o crescimento de *M.*

scabrella e, possivelmente, eliminar a necessidade de uso de fertilizantes no seu cultivo no campo, embora muitas estirpes desse gênero não tenham alcançado esse resultado. Como pode-se observar na Tabela 3, muitas estirpes obtiveram resultados semelhantes ao controle sem nitrogênio, o que demonstra a importância dos testes de seleção de bactérias eficazes na fixação biológica de nitrogênio.

A importância do genótipo da planta para o sucesso da fixação biológica de N_2 já foi descrita em diversos outros trabalhos (APPUNU et al., 2008; MUSIYIWA; MPEPEREKI; GILLER, 2005; HEFNY; DOLIŃSKI; MALEK, 2001) e está relacionada à especificidade de hospedeiro e diversos fatores da planta podem ser responsáveis pelo controle desse processo, como a capacidade fotossintética, balanço hormonal e atividades de enzimas relacionadas com a assimilação do N (HUNGRIA; BOHRER, 2000). Neste trabalho, as duas BFN utilizadas foram eficientes na fixação de N_2 quando inoculadas nas plantas das áreas 1 e 2, no entanto, seus resultados para a área 3 foram estatisticamente iguais ao controle sem nitrogênio, embora tenham sido capazes de formar nódulos, demonstrando que essas BFN não atuam na fixação de N_2 para plantas desse acesso. Os resultados não apresentaram interação entre BFN e progênies, sendo que a eficiência de cada bactéria foi estatisticamente igual em cada progênie avaliada.

Estudos futuros devem agora focar em testes à campo e combinações de diferentes estirpes a fim de investigar as interações entre simbiontes de origens diversas.

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso trabalho nos permite concluir que estirpes do gênero *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Cupriavidus* são capazes de formar nódulos em *M. scabrella*. Os isolados do gênero *Cupriavidus* não atuaram como fixadores de N_2 para esta planta, em contrapartida, alguns

isolados do gênero *Burkholderia* mostraram resultados de crescimento de *M. scabrella* iguais ao controle com nitrogênio adicionado. Também foi demonstrado que o acesso de *M. scabrella* pode influenciar no desempenho da bactéria fixadora de nitrogênio.

4.6 REFERÊNCIAS

ADEMAR, P. et al. Symbiotic efficiency of *Cupriavidus necator* strains tolerant to zinc, cadmium, copper and lead. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 85–95, 2012.

APPUNU, Chinnaswamy et al. Variation in symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* strains and soybean cultivars under field conditions. **Journal of Central European Agriculture**, v. 9, n. 1, p. 169-174, 2008.

AUMOND, J. J.; LOCH, C.; e COMIN, J. J. Systemic Approach and Use of Models for Rehabilitation of Degraded Areas. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, p. 1099–1118, 2012.

BARRETT, C. F. e PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium sp.* Nodule Bacteria on two *Mimosa spp.* in Costa Rica. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1198–1206, 2006.

BARTH, O. M. Melissopalynology in brazil: a review of pollen analysis of honeys , propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 342–350, 2004.

CHEN, W. et al. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266–7272, 2003

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp.* from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.

ELLIOTT, Geoffrey N. et al. *Burkholderia spp.* are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762–778, 2009.

EHRHARDT-BROCARD, N. C. M. **Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de diazotróficos isolados de bracatinga. 2013.** Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, 2013.

FARIA, S.M. de; E UCHÔAS, E. S., Indicação de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de uso múltiplo. **Embrapa**, Doc. 228, 2007.

FERREIRA, Paula Iaschitzki et al. Espécies potenciais para recuperação de áreas de preservação permanente no Planalto Catarinense. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2013.

GYANESHWAR, Prasad et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HEFNY, M.; DOLIŃSKI, R.; MAŁEK, W. Variation in symbiotic characters of alfalfa cultivars inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strains. **Biology and fertility of soils**, v. 33, n. 5, p. 435-437, 2001.

HUNGRIA, M. e ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** EMBRAPA. SPI. Brasília. 1994. 542p.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean

cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, n. 1, p. 45-52, 2000.

LAMMEL, Daniel R. et al. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LIU, X.Y. et al. Phylogenetic relationships and diversity of β -rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 61, p. 334-42, 2011.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RECH, T.D.; TORESAN, L. (Orgs.), **Bracatinga: cultivo, manejo e usos da espécie**. Florianópolis: Epagri, 2014.

MISHRA, Ravi PN et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 2, p. 487-503, 2012.

MOREIRA, Priscila Ambrósio et al. Genetic diversity and mating system of bracatinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern Brazil. **Agroforestry systems**, v. 83, n. 2, p. 245-256, 2011.

MÜLLER, J.J.V. **Levantamento Socioambiental do Inventário Florestal**. Florianópolis: Epagri, 2011.

MUSIYIWA, K.; MPEPEREKI, S.; GILLER, K. E. Symbiotic effectiveness and host ranges of indigenous rhizobia nodulating promiscuous soyabean varieties in Zimbabwean soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1169-1176, 2005.

SAKIA, R. M. The Box-Cox transformation technique: a review. **The statistician**, p. 169-178, 1992.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. 2013. www.statsoft.com.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.174p. (Boletim técnico, 5)

VANDAMME, Peter; COENYE, Tom. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

5 INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZAS ARBUSCULARES, BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO E BACTÉRIA ASSOCIATIVA NO CRESCIMENTO DE *Mimosa scabrella*, FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E ARQUITETURA RADICULAR

RESUMO

Microorganismos podem interagir com as plantas aumentando o desenvolvimento vegetal. Neste trabalho avaliaram-se os efeitos da inoculação de fungo arbuscular micorrízico (FMA), bactéria fixadora de nitrogênio (BFN) e bactéria associativa (BA), individualmente e em combinação, no crescimento, concentração de nitrogênio, nodulação e arquitetura da raiz de *M. scabrella* cultivada em solo com baixo teor de fósforo. Os resultados demonstraram que a co-inoculação de FMA e BFN aumentaram a massa da matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas, bem como a concentração de nitrogênio. Em relação à arquitetura radicular, a co-inoculação afetou positivamente o comprimento e volume radicular, área superficial, número de bifurcações e pontas. Além disso, a inoculação de BA não afetou o crescimento de *M. scabrella*, embora tenha diminuído o número de nódulos com sua presença.

Palavras-chave: interação microbiana; bracatinga; *Glomus intrarradices*; *Burkholderia* sp.

ABSTRACT

Microorganisms can interact in plants to increase the plant development. Here, we assessed the effects of arbuscular

mycorrhizal fungi (AMF), nitrogen fixing bacteria (NFB) and plant association bacteria (PAB) individually and in combination on the growth, nitrogen content, nodulation and root architecture of nutrient-poor *M. scabrella* pots. The results showed that the co-inoculation of AMF and NFB increased the shoot and root dry weight and the N concentration. Regards to the root architecture, the co-inoculation affected positively the root length, the surface area, root volume, number of forks and tips. Additionally we found out that the plant association bacterial did not affect *M. scabrella* growth, although the number of nodules has been decreased.

Keywords: microbial interaction; bracing; *Glomus intrarradices*; *Burkholderia* sp.

5.1 INTRODUÇÃO

As relações que podem ser estabelecidas pelas plantas e os microrganismos do solo são fundamentais para o desenvolvimento vegetal, principalmente as de natureza simbiótica, que envolvem absorção de nutrientes, promoção de crescimento, resistência à patógenos e estresse ambiental. Muitas bactérias são conhecidas pela sua capacidade de estimular o crescimento vegetal através de interações diretas e indiretas com as raízes das plantas (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006). Além disso, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são microrganismos reconhecidamente importantes na simbiose com plantas, formando interações com o sistema radicular, ligado a muitas funções que incluem o incremento na aquisição de nutrientes e a resposta da planta a estresse biótico e abiótico (KOLTAI; KAPULNIK, 2010). Bactérias associativas (BA) desempenham um papel fundamental para a saúde da planta e promoção de crescimento (COMPANT; CLÉMENT; e SESSITSCH, 2010), melhorando a incorporação de nutrientes, bem como outros processos

ligados à produção de hormônios, solubilização de fosfatos e controle biológico (MOREIRA et al., 2010). Bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) fazem parte de um grupo de microrganismos amplamente distribuídos nas raízes de leguminosas e desempenham um papel central na melhoria da fixação de nitrogênio (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009).

Neste trabalho, testaram-se a interação entre esses microrganismos nas raízes de bracatinga (*Mimosa scabrella*), uma leguminosa arbórea de crescimento rápido, nativa da Floresta de Araucária (Floresta Ombrófila Mista) no Brasil. Essa planta é essencial na produção de um melato característico do sul do Brasil (BARTH, 2004), são usadas na recuperação de áreas degradadas (FERREIRA et al., 2013; AUMOND; LOCH; COMIM, 2012) e, mais comumente, na produção de lenha utilizada como fonte de energia (MAZUCHOWSKI et al., 2014; MÜLLER, 2011). Observações a campo mostraram que esta espécie tem sido bem sucedida em terras muito perturbadas, crescendo espontaneamente, como nas bordas das rodovias e em áreas sob corte da vegetação, em substratos com pouco solo e pobres em nutrientes. Solos em que *M. scabrella* ocorre naturalmente são normalmente pobres em nitrogênio e fósforo (MAZUCHOWSKI, 2012), o que sugere que microrganismos devem desempenhar importantes funções do crescimento dessa planta.

A importância de BFN na simbiose com *M. scabrella* tem sido demonstrada em diversos trabalhos (LAMMEL et al., 2013; COELHO et al., 2007; FARIA; UCHÔAS, 2007), nos quais estirpes selecionadas foram eficientes na fixação do nitrogênio para esta planta. Embora BFN do gênero *Burkholderia* sp. tenham sido as estirpes mais comumente isoladas em nódulos de *M. scabrella*, (GYANESHWAR et al. 2011), outros gêneros também foram isolados, como *Cupriavidus* e *Rhizobium*, além de diversas bactérias

associativas (LAMMEL et al. 2013; CHEN et al. 2005). Essas bactérias associativas tem sido descritas vivendo em nódulos de diferentes leguminosas (DENG et al., 2011; STAJKOVIC et al., 2009; LI et al., 2008; ZAKHIA et al., 2006; HOQUE; BROADHURST; THRALL, 2011; PALANIAPPAN et al., 2010). No entanto, a funcionalidade destas bactérias ainda não foi muito explorada em plantas leguminosas e podem aumentar a produtividade e o crescimento das plantas (MOREIRA et al., 2010). Contudo, os papéis ecológicos destes endosimbiontes em solos ou dentro dos nódulos não são bem compreendidos.

FMA também foram identificados vivendo em simbiose com o sistema radicular de *M. scabrella* (ANDRADE et al., 2000), mas sua importância para esta planta não tem sido o principal foco. Em um trabalho recente, Lammel et al. (2015) destacaram o FMA do gênero *Acaulospora* spp. como predominante nas raízes de *M. scabrella* e importante para o desenvolvimento vegetal. A simbiose desenvolvida entre a planta e o FMA permite ao fungo obter carboidratos para o seu metabolismo e, em contrapartida, a planta pode receber nutrientes, melhorando seu desenvolvimento (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006), tolerância à infecção por patógenos (LEWANDOWSKI et al., 2013) e aumento da área radicular (WANG et al., 2011). No entanto, enquanto os efeitos independentes do FMA, BFN e BA no desenvolvimento de plantas já foram abordados, muito pouco se sabe sobre como esses grupos funcionais podem interagir para influenciar a estrutura da raiz e produtividade das plantas.

Neste trabalho, testaram-se os efeitos do FMA, BFN e BA individualmente e em combinação no crescimento, concentração de nitrogênio, nodulação e arquitetura da raiz de *M. scabrella* cultivada em solo com baixo teor de fósforo. As hipóteses testadas foram: 1) FMA tem importância para o crescimento de *M. scabrella* em solos com baixo teores de fósforo; 2) O sinergismo entre BFN e FMA melhora o crescimento e absorção de nitrogênio para *M. scabrella*; 3) A

arquitetura radicular de *M. scabrella* é afetada pela presença de FMA e: 4) A inoculação de BA não afeta o desenvolvimento das plantas inoculadas com BFN e/ou FMA.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Organismos estudados

Mimosa scabrella foi escolhida porque é uma planta leguminosa, nativa do sul do Brasil, capaz de se associar com diferentes microrganismos simbiotes e hospedeira original das bactérias utilizadas neste trabalho. Sementes foram coletadas de uma única planta, localizada no município de Urupema, estado de Santa Catarina, Brasil, em 2013 (27°57'41.75 "S e 49°50'40.90"W) e mantidas sob refrigeração, 2 a 5°C.

Duas bactérias foram selecionadas para este trabalho, isoladas de nódulos ativos de *M. scabrella*, em 2013, ambas pertencentes ao gênero *Burkholderia*. No entanto, experimento anterior para confirmação de nodulação demonstrou que uma dessas bactérias formava nódulos e era eficiente na fixação de nitrogênio para a planta, enquanto a outra estirpe não formou nódulos e a capacidade de promover o crescimento da planta não foi testada, classificada aqui como bactéria associativa (BA).

O inoculante de FMA utilizado foi *Glomus intraradices*, um microrganismo naturalmente benéfico que coloniza diferentes comunidades de plantas atuando, principalmente, na absorção de nutrientes. O inóculo consistiu com 500 propágulos viáveis por grama do inoculante comercial MYKE PRO (Premier Tech Biotechnologies, Rivière du Loup, Québec, Canadá). O inóculo foi examinado para confirmar a aparência saudável dos esporos, ocorrência de espécies não alvo e a capacidade de germinação. Para essa avaliação, os esporos foram colocados em papel filtro com solo esterilizado e incubados à 28°C durante sete dias. Os esporos foram

analisados diariamente em microscópio óptico, e sua viabilidade foi confirmada.

5.2.2 Delineamento experimental e condições de crescimento

O experimento foi implantado em esquema fatorial, com delineamento completamente casualizado, consistindo de três fatores: FMA, BFN e BA. Os tratamentos foram organizados em todas as combinações possíveis, incluindo um controle sem microrganismos, totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi replicado seis vezes e colocados em câmara de crescimento com temperatura constante (25°C), 55% de umidade do ar e 14 horas de fotoperíodo, durante 90 dias.

Solo foi coletado onde *M. scabrella* não cresce naturalmente em Sault Ste Marie, Canadá. O solo era predominantemente siltoso, pH 5,8 0,13% de nitrogênio total, 1,81% de C, 11,4 mg Kg⁻¹ de P extraível, 360,7 de Ca mg Kg⁻¹, 48,9 mg Kg⁻¹ de K, e 38,9 mg Kg⁻¹ de Mg. O solo, areia e turfa foram esterilizados separadamente (por uma hora a 121 °C, num ciclo de vácuo) e, em seguida, misturada em proporções iguais.

As sementes de *M. scabrella* foram esterilizadas superficialmente com 96% de etanol por 1 minuto, 3% de hipoclorito de sódio por 5 minutos e lavadas por 5 vezes em água destilada. Para quebra da dormência, as sementes foram imersas em água quente (80°C) durante 5 minutos e deixadas imersas na água, à temperatura ambiente por 18 horas. As sementes foram germinadas em papel filtro, na estufa à 28°C até as radículas alcançarem 2 cm. Então, as mudas foram transplantadas para potes de 2,8 L contendo o substrato formado por solo, areia e turfa (1:1:1) descrito acima. A fertilização do solo foi realizada pela adição semanal de 100 mL de solução nutritiva de Hoagland, modificada sem

nitrogênio e para manter a concentração de P em 20 mg Kg⁻¹, considerada baixa para plantas, mas ainda acima das concentrações encontradas em solos onde esta espécie ocorre naturalmente (MAZUCHOWSKI et al., 2012).

Os tratamentos com FMA foram inoculados com 10 g do inóculo de *Glomus intraradices*, colocando uma fina camada 1 cm abaixo da superfície do substrato, onde as mudas foram transplantadas. Os vasos atribuídos ao teste com as bactérias foram inoculados com 1 mL do caldo bacteriano formado em meio líquido levedura manitol, que foi incubado à 28°C em agitador de bancada, com temperatura controlada e contendo aproximadamente 10⁹ UFC mL⁻¹ (HUNGRIA; ARAUJO, 1994). A inoculação foi realizada sete dias após o transplante das mudas para permitir o estabelecimento no substrato.

5.2.3 Colheita e variáveis analisadas

As plantas foram colhidas depois de 90 dias de crescimento. O substrato foi removido do sistema radicular das plantas, secos em temperatura ambiente e armazenados em sacos plásticos. A parte aérea e raízes foram separadas a partir do colo da planta. Raízes foram lavadas e os nódulos separados e contados para avaliar a nodulação. Em seguida, o sistema radicular foi armazenado em etanol 50%. A parte aérea da planta e os nódulos foram secos em estufa de circulação forçada à 60°C até obtenção da massa constante e então pesados.

Todo o sistema radicular das plantas foi escaneado com auxílio do programa WinRhizo Pro (2009) na impressora Epson Expression 10000 XL. Para o escaneamento, as raízes foram removidas do etanol 50% e imersas em água em uma bandeja transparente fornecida pela Regent Instruments. Os dados foram coletados em cada repetição para as seguintes variáveis: comprimento total da raízes, área superficial,

diâmetro médio das raízes, volume ocupado no solo, número de bifurcações e número de pontas.

As raízes foram cortadas em segmentos 1 cm e uma subamostra representativa de cada repetição foi colocado em cassetes (HistoPrep OmniS- ette; Fisher Scientific Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). As amostras foram clareadas com KOH 10% por 1 hora à 80°C, acidificado com HCl 1% por 20 minutos e então, coradas com azul de Tripiano (0,05%). As raízes coradas foram imersas em lactoglicerol e deixadas overnight para remover o excedente de corante e, logo após, colocadas em lâminas microscópicas para análise de presença de estruturas fúngicas (hifas intraradiculares, vesículas e arbúsculos). O percentual de colonização micorrízica foi medido pelo método de intersecção das linhas de grade, em 200x de ampliação (MCGONIGLE et al., 1990)

5.2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando as diferenças foram significativas, o teste de separação de médias Tukey ($p > 0,05$) foi aplicado. A transformação Box-Cox foi utilizada, quando necessário, a fim de estabilizar a variância residual (SAKIA, 1992). Os procedimentos estatísticos foram executados usando o programa Statistica (StatSoft, 2013).

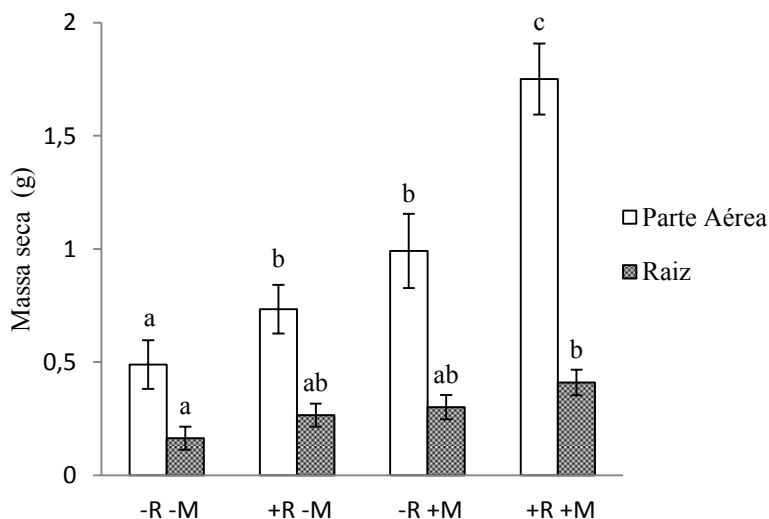
5.3 RESULTADOS

5.3.1 Crescimento da planta

O crescimento de *Mimosa scabrella* foi fortemente afetado pela inoculação de FMA e BFN simultaneamente, aumentando os resultados da massa seca da parte aérea e da raiz (Fig. 6). Por outro lado, a bactéria associativa (BA) não teve efeito significativo (dados não mostrados). A inoculação com o FMA *Glomus intraradices* e a BFN *Burkholderia sp.*, individualmente, aumentaram significativamente a massa seca da

parte aérea (MSPA) comparados com o controle sem estes microrganismos. No entanto, quando as plantas foram co-inoculadas com esses dois microrganismos, a MSPA foi ainda maior, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. A co-inoculação aumentou 257% para a MSPA e 150% para massa seca da raiz (MSR) quando comparadas com o controle. Se comparadas com as plantas inoculadas individualmente com BFN e FMA, a co-inoculação aumentou a MSPA em 76,5% e 138,6%, respectivamente.

Figura 6. Efeitos da co-inoculação com FMA *Glomus intraradices* (+M) e BFN *Burkholderia sp.* (+R) em *M. scabrella*. Massa da matéria seca da parte aérea e raiz depois de 3 meses de cultivo sob condições de câmara de crescimento. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). $n=12$. Barras indicam o erro-padrão.



5.3.2 Colonização micorrízica e nodulação por BFN

O número de nódulos (NN) e a massa seca de nódulos (MSN) aumentaram pela inoculação de FMA e BA (fig. 8). Os tratamentos inoculados com o FMA aumentaram significativamente a MSN e o NN. No entanto, quando BA foi inoculada simultaneamente, o NN diminuiu.

Glomus intraradices foi capaz de colonizar as raízes de *M. scabrella* (fig. 7) e a colonização total (CT) foi influenciada pela co-inoculação com FMA e BA (Fig. 9). Quando o FMA foi inoculado sozinho, a CT foi de 48%. A CT foi aumentada na presença de BFN (89%), BA (79%) ou ambas ao mesmo tempo (68%).

Figura 7. Microfotografia da presença de estruturas do FMA *Glomus intraradices* no interior do sistema radicular de *M. scabrella*. Setas indicam estruturas fúngicas como vesículas (v) e hifas (h).

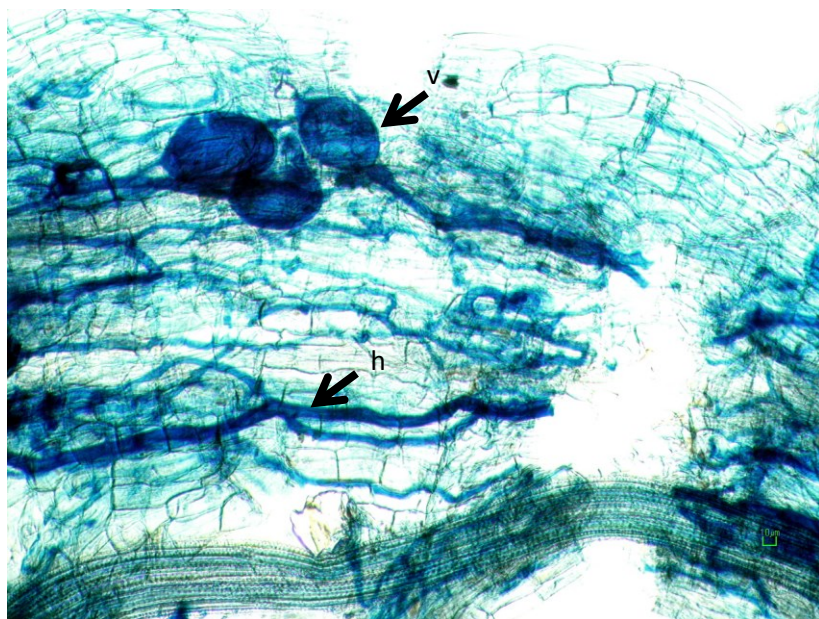


Figura 8. Efeito da co-inoculação com FMA *Glomus intraradices* (+M) e BA *Burkholderia sp.* (+E) em *M. scabrella*. A) Número de nódulos e B) Massa seca de nódulos de raízes de *Mimosa scabrella*. Os valores apresentados são as médias (n=6) com erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0.05$).

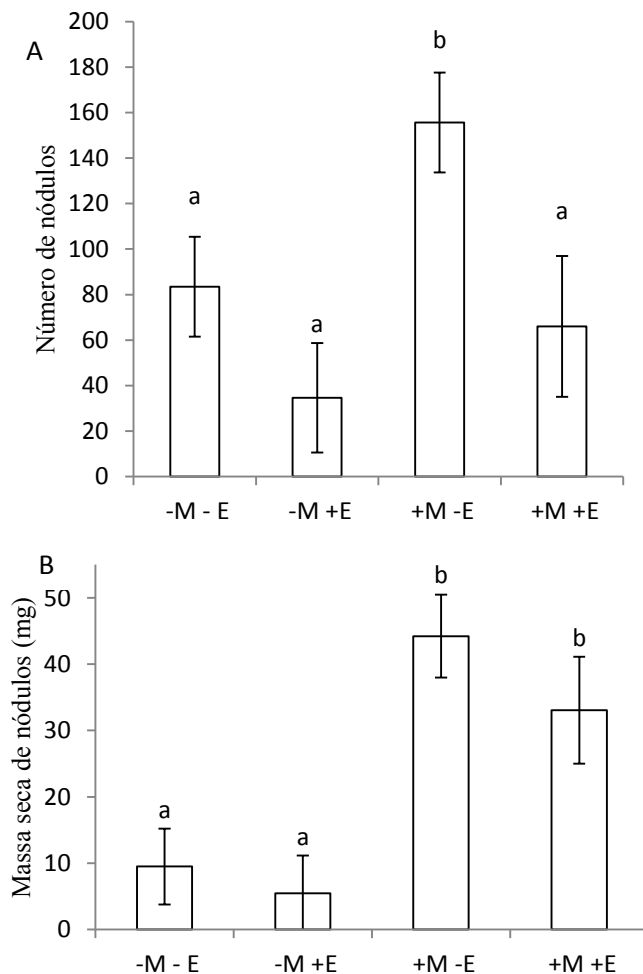
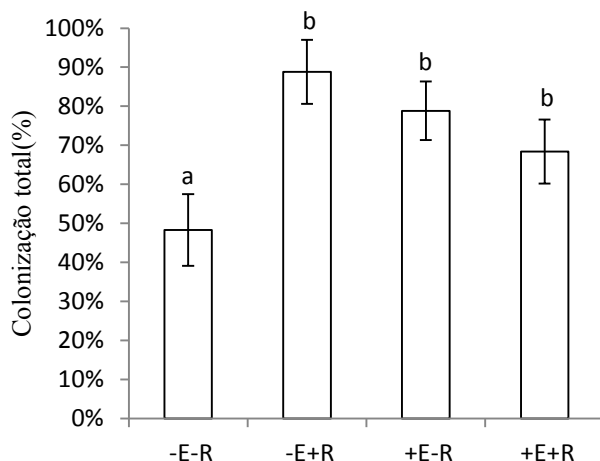


Figura 9. Colonização micorrízica total por *Glomus intraradices* (+M) e sua interação com bactéria associativa (+E) e bactéria fixadora de nitrogênio (+B) em *M. scabrella*. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). $n=6$. Barras indicam erro-padrão.

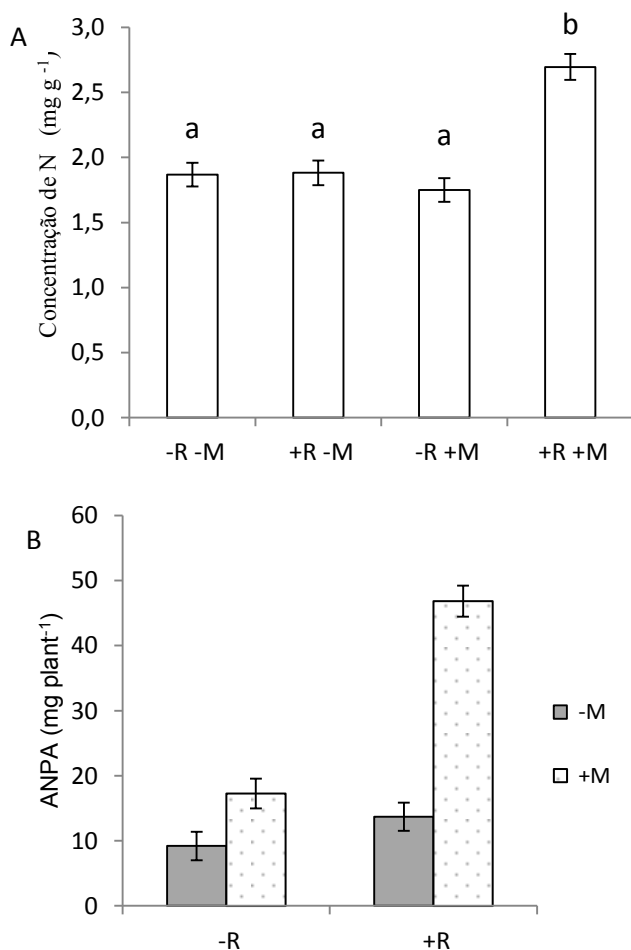


5.3.3 Acúmulo de Nitrogênio

A concentração de nitrogênio nos tecidos de *M. scabrella* foi significativamente afetada pela co-inoculação de BFN e FMA (Fig. 10), enquanto que a inoculação da BA não influenciou o teor de nitrogênio na planta. Interessantemente, não houve efeito na concentração de nitrogênio quando o FMA ou a BFN foram inoculadas individualmente, mas, pelo menos em condições com baixos teores de fósforo e nitrogênio no solo, a co-inoculação com esses dois microrganismos apresentou efeitos sinérgicos, aumentando em 42% a concentração de nitrogênio quando FMA e BFN estavam presentes ao mesmo tempo. Os resultados do acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA) foram significativos quando *M. scabrella* foi inoculada com FMA ou BFN. No entanto, no

tratamento com a co-inoculação desses microrganismos, o ANPA aumentou 3,4 vezes.

Figura 10. (A) Concentração de nitrogênio e (B) Acúmulo de nitrogênio da parte aérea (ANPA) em *M. scabrella* sob inoculação com bactéria fixadora de nitrogênio (+R) e fungo micorrízico arbuscular (+M). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$). $n=12$. Barras indicam erro-padrão.



5.3.4 Arquitetura radicular

A inoculação com FMA não afetou o crescimento da raiz, como está demonstrado pelo comprimento total radicular, área superficial da raiz, volume radicular, número de bifurcações e pontas comparado com o controle sem microrganismo (Tab. 4). No entanto, quando o FMA foi co-inoculado com BFN ou BA, os resultados foram significativamente maiores do que os tratamentos com FMA sozinho e o controle. Os efeitos sinérgicos da co-inoculação aumentaram o comprimento total radicular, área superficial da raiz, volume radicular e número de pontas. Os maiores resultados para os parâmetros radiculares foram alcançados quando o FMA foi co-inoculado com a BFN, afetando positivamente o comprimento total radicular, área superficial da raiz, volume radicular, número de bifurcações e pontas. Quando a BA foi inoculada juntamente com o FMA e BFN as variáveis diminuíram em quase todas as situações, mas foi estatisticamente significativo apenas para área superficial da raiz. Em relação à inoculação com a BFN, apenas o número de bifurcações foi aumentado significativamente nas raízes de *M. scabrella*.

Tabela 5. Arquitetura radicular de *Mimosa scabrella* após cultivo em condições de câmara de crescimento, inoculados (+) ou não (-) com fungo micorrízico arbuscular (M), com bactéria fixadora de nitrogênio (R) e bactéria associativa (E). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, Tukey ($P \leq 0.05$).

	Comprimento radicular (m planta ⁻¹)	Área superficial (cm ² planta ⁻¹)	volume radicular (cm ³ planta ⁻¹)	número de bifurcações [†]	número de pontas [†]
-M-E-R	1.2 bc	150 cd	1.5 bc	3,5 c	0,7 c
-M-E+R	1.7 abc	219 bcd	2.3 abc	12,2 ab	1,7 bc
-M+E-R	1.4 abc	182 bcd	1.8 abc	4,6 abc	1,2 bc
-M+E+R	1.6 abc	233 abc	2.1 abc	6,8 abc	1.9 ab
+M-E-R	0.7 c	96 d	0.9 c	3.1 c	1.2 bc
+M+E-R	2.4 ab	299 ab	3.0 ab	8.8 abc	1.9 ab
+M-E+R	2.8 a	347 a	3.5 a	13.9 a	3.2 a
+M+E+R	1.3 abc	165 bcd	1.6 abc	9.0 ab	1.6 abc

5.4 DISCUSSÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem sido relacionado como um importante microrganismo simbiótico para as plantas e com capacidade de estabelecer efeitos sinérgicos com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) uma vez inoculados em leguminosas (ARTURSSON; FINLAY; JANSSEN, 2006; TAJINI; DREVON, 2012; WANG et al., 2011; YASMEEN et al., 2012). No entanto, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, esta abordagem para *M. scabrella*. FMA foi, inicialmente, identificado infectando raízes de *M. scabrella* por Andrade et al., (2000), e mais recentemente por Lammel et al., (2015). Os resultados suportam a hipótese de que FMA tem grande importância para o crescimento de *M. scabrella* em substratos pobres em fósforo e que o sinergismo entre FMA e BFN aumentam o crescimento

e absorção de nitrogênio para esta planta. A capacidade de mediar a absorção de nutrientes pelas associações micorrízicas é considerado em muitos artigos, principalmente quando o fósforo é o principal limitante (SMITH; SMITH, 2011), mas o seu papel na incorporação de nitrogênio ainda não é totalmente esclarecida (VERESOGLOU et al., 2012; CORREA et al., 2015). Neste trabalho, FMA e BFN, inoculadas individualmente, não foram capazes de aumentar as concentrações de nitrogênio na planta, mas, quando co-inoculadas, os resultados da concentração de nitrogênio foram aumentados em 42%, demonstrando a importância desta interação para o desenvolvimento da *M. scabrella*. Este efeito sinérgico entre FMA e BFN também relatados para outras leguminosas, como soja (WANG et al., 2011), feijão caupi (LIMA et al., 2011) e feijão comum (TAJINI; DREVON, 2012) e deve desempenhar papel crucial na sustentabilidade dos sistemas agrícolas, principalmente diminuindo a pressão sobre o uso de fertilizantes (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006).

A presença do FMA também aumentou a nodulação em *M. scabrella*. FMA pode contribuir para o aumento do nível de nutrientes, quando tanto o nitrogênio quanto o fósforo são limitantes. Micorrizas podem melhorar a absorção de fósforo pela planta que por sua vez resultaria em mais energia disponível para a fixação de nitrogênio (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006). Por outro lado, a inoculação de BFN e BA aumentaram significativamente a colonização total das raízes. Existem muitos mecanismos sugeridos para esse efeito auxiliar, incluindo estímulo ao desenvolvimento da raiz, aumento da suscetibilidade da raiz à colonização micorrízica, ou o aperfeiçoamento do processo de reconhecimento entre a raiz e o FMA (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006). As bactérias associativas (BA) são, muitas vezes, reconhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR), capazes de estimular o crescimento da planta por meio

de mecanismos diretos ou indiretos com as raízes da planta. Neste trabalho, BA não afetou o crescimento da planta ou a concentração de nitrogênio, mas foi capaz de aumentar a colonização micorrízica na ausência da BFN e diminuir a nodulação. Este é um resultado interessante, pois a BA foi isolada vivendo dentro de nódulos de *M. scabrella*. Analisando nódulos de soja, Moawad e Schmidt (1987) encontraram mais de uma espécie de rizóbio nos nódulos em mais de 32% das amostras. Lammel et al. (2013) encontraram BA co-infectando nódulos de *M. scabrella* e sugeriram que elas deveriam ser bactérias oportunistas. No entanto, os dados desse trabalho não suportam a hipótese de que a inoculação de BA não afeta os resultados de plantas co-inoculadas com BFN e FMA. Esta questão precisa ainda ser mais bem explorada, a fim de recuperar a ideia de que a diversidade de microrganismos no interior do nódulo pode interagir de forma positiva ou não para o desenvolvimento das plantas e para o sucesso da fixação de nitrogênio (KIERS; DENISON, 2014).

A colonização micorrízica mostrou ser capaz de induzir modificações na arquitetura radicular de diferentes plantas. Na soja (WANG et al., 2011) e laranja (YAO et al., 2009), a colonização por FMA diminuiu significativamente os parâmetros radiculares, como comprimento, área superficial e volume total. Já em *Vitis vinifera* (SCHELLENBAUM et al. 1991), alho-poró (BERTA, et al., 1990) e alfarroba (CRUZ et al., 2004) esses parâmetros foram aumentados. Estes resultados irregulares para diferentes plantas indicam que os efeitos da associação com FMA na arquitetura radicular deve ser dependente da espécie de planta e fungo utilizada. Neste estudo, a colonização por FMA não afetou a arquitetura radicular, no entanto, houve interação quando o FMA foi co-inoculado com BFN e BA. Neste caso, os resultados foram maiores que o FMA sozinho e o controle, demonstrando que as interações entre esses microrganismos precisam ser melhor compreendidas.

5.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados mostraram um efeito sinérgico da co-inoculação da bactéria fixadora de nitrogênio e do fungo micorrízico arbuscular em *M. scabrella*, aumentando o crescimento, concentração de nitrogênio e a arquitetura da raiz. Além disso, os resultados demonstraram que a inoculação com bactéria associativa pode afetar negativamente o número de nódulos em *M. scabrella*, no entanto, não afetou o crescimento da planta.

5.6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.C.S. et al., Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina , Brazil. **Mycorrhiza**, p.131–136. 2000.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; e JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental microbiology**, 8(1), p.1–10, 2006.

AUMOND, J.J.; LOCH, C.; E COMIM, J.J. Systemic Approach and Use of Models for Rehabilitation of Degraded Areas. **Revista Árvore**, 36(6), p.1099–1118, 2012.

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys , propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 342–350, 2004.

BERTA, G. et al. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. **New Phytologist**, p. 207-215, 1990.

CHEN, W. et al. Proof that Burkholderia Strains Form Effective Symbioses with Legumes : a Study of Novel Mimosa -Nodulating Strains from South America Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes : a Study of Novel *Mimosa* -Nodulating Strains from. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461–7571, 2005.

CHEN, W. et al. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055–1059, 2007.

COELHO, S.R.D.F. et al. Crescimento, nutrição e fixação biológica de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(6), p.759–768, 2007.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; E SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, 42(5), p.669–678, 2010.

CORRÊA, A.; CRUZ, C.; FERROL, N. Nitrogen and carbon/nitrogen dynamics in arbuscular mycorrhiza: the great unknown. **Mycorrhiza**, p. 1-17, 2015.

CRUZ, Cristina et al. Functional aspects of root architecture and mycorrhizal inoculation with respect to nutrient uptake capacity. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 3, p. 177-184, 2004.

DENG, Zhen Shan et al. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 3, p. 463-475, 2011.

FARIA, S.M. de; E UCHÔAS, E. S., Indicação de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de uso múltiplo. **Embrapa**, Doc. 228, 2007.

FERREIRA, Paula Iaschitzki et al. Espécies potenciais para recuperação de áreas de preservação permanente no Planalto Catarinense. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2013.

FRANCHE, Claudine; LINDSTRÖM, Kristina; ELMERICH, Claudine. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous

and non-leguminous plants. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 35-59, 2009.

GYANESHWAR, Prasad et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HOQUE, Mohammad S.; BROADHURST, Linda M.; THRALL, Peter H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 2, p. 299-309, 2011.

KIERS, E. Toby; DENISON, R. Ford. Inclusive fitness in agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1642, 2014.

KOLTAI, H.; e KAPULNIK, Y. (eds). **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**, New York: Springer. 2010.

LAMMEL, Daniel R. et al. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LAMMEL, Daniel R. et al. Woody Mimosa species are nodulated by *Burkholderia* in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Plant and Soil**, p. 1-13, 2015.

LEWANDOWSKI, Thaddeus J. et al. Isolate identity determines plant tolerance to pathogen attack in assembled

mycorrhizal communities. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61329, 2013.

LI, Ji Hong et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LIMA, André Suêlto Tavares de et al. Triple inoculation with *Bradyrhizobium*, *Glomus* and *Paenibacillus* on cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] walp.) development. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 919-926, 2011.

HUNGRIA, Marianagela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

MAZUCHOWSKI, J.Z., **Sistema de produção de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) sob técnicas de manejo silvicultural**. Universidade Federal do Paraná. 2012.

MAZUCHOWSKI, J.Z., RECH, T.D., TORESAN, L. (Orgs.) **Bracatinga: cultivo, manejo e usos da espécie**. Epagri, Florianópolis, 2014.

MCGONIGLE, T. P. et al. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New phytologist**, p. 495-501, 1990.

MOAWAD, M.; SCHMIDT, E. L. Occurrence and nature of mixed infections in nodules of field-grown soybeans (*Glycine max*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 5, n. 2, p. 112-114, 1987.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza et al. Biazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

MÜLLER, J.J.V. **Levantamento Socioambiental do Inventário Florestal**. Epagri, Florianópolis. 2011.

PALANIAPPAN, Pitchai et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza sp.* **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 8, p. 807-816, 2010.

SAKIA, R. M. The Box-Cox transformation technique: a review. **The statistician**, p. 169-178, 1992.

SHELLENBAUM, L. et al. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). **Annals of Botany**, v. 68, n. 2, p. 135-141, 1991.

SMITH, F. Andrew; SMITH, Sally E. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants?. **Plant and Soil**, v. 348, n. 1-2, p. 63-79, 2011.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. 2013. www.statsoft.com.

STAJKOVIĆ, Olivera et al. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica serbica**, v. 33, n. 1, p. 107-114, 2009.

TAJINI, Fatma; DREVON, Jean-Jacques. Effect of arbuscular mycorrhizas on P use efficiency for growth and N₂ fixation in

common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 16, p. 1681-1689, 2012.

VERESOGLOU, Stavros D.; CHEN, Baodong; RILLIG, Matthias C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 53-62, 2012.

WANG, Xiurong et al. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 3, p. 173-181, 2011.

YAO, Q. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p. 458-461, 2009.

YASMEEN, Tahira et al. Significance of arbuscular mycorrhizal and bacterial symbionts in a tripartite association with *Vigna radiata*. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1519-1528, 2012.

ZAKHIA, Frédéric et al. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. **Microbial ecology**, v. 51, n. 3, p. 375-393, 2006.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bracatinga (*Mimosa scabrella*) é um exemplo de espécie nativa, que assim como outras, possui grande potencial de uso, mas preterida por outras espécies vegetais exóticas. Diversos estudos tem demonstrado que o uso sustentável dessa espécie é possível e seu manejo pode auxiliar no incremento da renda do pequeno agricultor e também auxiliar na conservação da Mata de Araucária.

Com o resultado deste trabalho podemos perceber a importância das associações entre microrganismos e a bracatinga para o sucesso de seu crescimento no ambiente. Conhecida por ser pioneira em seu bioma, essa espécie consegue se estabelecer em ambientes pobres em nutrientes, solos ácidos e pouco estruturados. Essa capacidade só é possível devido a suas interações com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares. No entanto, o papel das bactérias associativas isoladas de dentro dos nódulos, bem como a seleção de sementes com características específicas para determinado uso ainda são necessários.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, Bruno JR; BODDEY, Robert M.; URQUIAGA, Segundo. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.

ANDRADE, A.C.S. et al., Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina , Brazil. **Mycorrhiza**, p.131–136. 2000.

BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M.. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e a identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SILVA SANTOS, C.E.R.; STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE; Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 13**, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, nº 58, 25 de março de 2011, p. 3-7.

CARPANEZZI, A. A.; CARPANEZZI, OTB. Cultivo da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) no Brasil e prioridades para o seu aperfeiçoamento. In: **CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p. 640-655.

CARVALHO, P. E. R. **Bracatinga**. Colombo: Embrapa Florestas. 2002. 12 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 59).

CHEN, W. et al. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β - Proteobacteria Is Widespread in Nature Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266–7272, 2003

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

CHEN, Wen-Ming et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp.* from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.

DE FARIA, S. M.; UCHOAS, E. da S. Indicação de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de uso múltiplo, atualização ano base 2006. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, 2007.

DOS REIS JR, Fábio Bueno et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa spp.* in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010.

EMBRAPA-URPFCS, Unidade Regional de Pesquisa; CENTRO-SUL, Florestal. Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 6.: Situação da entomologia e da patologia florestal no Brasil, Curitiba, 1982. Anais. 1983.

MÜLLER, J.J.V. **Levantamento Socioambiental do Inventário Florestal**. Florianópolis: Epagri, 2011.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. **Manual técnico da bracatinga** (*Mimosa scabrella* Benth.). Curitiba: Embrapa CNPF, 1988. 70p. (Embrapa-CNPF. Documentos, 20).

FREITAS, E.et al., **Tabela de composição químico-bromatológica e energética dos alimentos para animais ruminantes em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1994. 33 p. (Epagri. Documentos, 155).

GLYAN'KO, A. K. Signaling systems of rhizobia (*Rhizobiaceae*) and leguminous plants (Fabaceae) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 494-504, 2015.

GYANESHWAR, Prasad et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

JESUS, E.da C.; SCHIAVO, J.A.; FARIA, S.M. de. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas florestais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, p. 545-552, 2005.

LAMMEL, Daniel Renato. **Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. 2007. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

LAMMEL, Daniel R. et al. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LEWANDOWSKI, Thaddeus J. et al. Isolate identity determines plant tolerance to pathogen attack in assembled mycorrhizal communities. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61329, 2013.

LIMA, C.E.P; ACIOLI-SANTOS; B. ANTONIOLLI, Z.I.; ROSSI, M.J. Inoculantes de fungos micorrízicos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SILVA SANTOS, C.E.R.; STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE; Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.

LISBÃO JUNIOR, L. Bracatinga como fonte energética. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 4., **"Bracatinga uma alternativa para reflorestamento"**, Curitiba, 1981. Anais..., Curitiba: EMBRAPA/URPFCS, 1981. 198 p. (EMBRAPA-URPFCS. Documentos, 5). p. 133-143.

MARTINS, L. M. V. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. EMBRAPA-CNPAB, 1997.

MAZUCHOWSKI, J.Z., RECH, T.D., TORESAN, L. (Orgs.) **Bracatinga: cultivo, manejo e usos da espécie**. Epagri, Florianópolis, 2014.

MENDES FILHO, JM de A. Comportamento de tres especies florestais em solo alterado pela exploracao do xisto na regioao de Sao Mateus do Sul-PR [Bracatinga, *Mimosa scabrella*, eucalipto, *Eucalyptus viminalis*, pinheiro, *Pinus taeda*, recurso energetico, recuperacao do solo, Parana, Brasil]. **Documentos- Unidade Regional de Pesquisa Florestal Centro-Sul (Brazil). no. 5.**, 1981.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2 ed. Lavras: UFLA, 2006.

MOREIRA, F.M.S et al. Bactérias fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SILVA SANTOS, C.E.R.; STAMFORD, N.P. **Biotechnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE; Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.

SCHÜSSLER, A.; KLUGE, M. *Geosiphon pyriforme*, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In: **Fungal associations.** Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 151-161.

SIMINSKI, A. et al., **Projeto Bracatinga.** Florianópolis: NPFT, 2007. 20 p.

SMITH, Sally E.; READ, David J. **Mycorrhizal symbiosis.** Academic press, 2010.

SPRENT, Janet I.; PLATZMANN, Julius. **Nodulation in legumes.** Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.

STEENBOCK, W. **Domesticação de bracatingais: perspectivas de inclusão social e conservação ambiental**. 2009. 262f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

STROSCHEIN, M.R. **Seleção de rizóbios e efeito do nitrogênio na simbiose com alfafa e cornichão**. 2011. 140f. Tese. (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

VANDAMME, Peter; COENYE, Tom. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

ZANGARO, W. et al. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.19, p.315-324, 2003.