**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no
Estado de São Paulo**

Daniel Renato Lammel

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Solos e Nutrição de Plantas**

**Piracicaba
2007**

Daniel Renato Lammel
Engenheiro Agrônomo

**Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no
Estado de São Paulo**

Orientadora:
Prof^a. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas**

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Lammel, Daniel Renato

Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo / Daniel Renato Lammel. - - Piracicaba, 2007.
116 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Áreas de conservação 2. Árvores florestais 3. Bactérias fixadoras de nitrogênio
4. Biodiversidade 5. Florestas – Mata Atlântica 6. Pinheiros 7. Reflorestamento I. Título

CDD 634.9

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A uma maior harmonia
entre os homens,
e dos homens com a natureza,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de uma belíssima e complexa natureza, foco da curiosidade humana que tenta compreendê-la através da ciência. Ao Espírito Santo que nos motiva e inspira nesta busca. A Jesus Cristo e seu maior ensinamento, o amor, chave e motivação para a luta por um mundo melhor, com relações harmônicas entre os homens e dos homens com a natureza.

Com um grande carinho, a toda minha família, em especial a meu pai Paulo Renato, a minha mãe Erika e minha irmã Chris, que sempre me apoiaram e deram todas as condições para que pudesse chegar até aqui. Amo vocês!

À araucária, bela árvore que admiro desde pequeno, por suas belas florestas, nas quais pude por muitas vezes caminhar e acampar, e pelo pinhão, que muitas vezes alegrou festas, reuniões familiares e de amigos no frio inverno curitibano. Símbolo de meu estado, o pinheiro-do-Paraná é também relacionado ao nome da minha cidade natal, Curitiba, do tupi guarani “terra de muito pinhão”. Sua importância, como será mostrada, vai muito além de sua relação cultural, a qual vivenciei, fato que motiva sua pesquisa e motivou o presente estudo. A ganância humana colocou-a em risco de extinção e agradeço pela oportunidade de trabalhar no grupo de pesquisa da profa. Dra. Elke J. B. N. Cardoso, em um esforço contrário.

À professora Elke, exemplo de dedicação e perseverança, pelas importantes discussões, orientação e constante incentivo ao espírito crítico, à ética e à preservação ambiental. Expresso também minha admiração à professora em orientar um grupo tão grande, no momento dez pós-graduandos e seis estagiários, e ao mesmo tempo não perdendo o comprometimento com aulas, projetos e a sua família.

Ao grupo de pesquisa em Microbiologia e Biotecnologia do Solo da ESALQ, liderado pela Dra. Elke J. B. N. Cardoso, pelas importantes discussões, colaborações no trabalho, além dos excelentes momentos de convivência. Agradecimento especial aos técnicos Denise Mescolotti e Luis Fernando Baldesin, pela habitual disposição e amizade. Ao colega do projeto temático “Biota”, Dilmar Baretta, pela amizade, discussões e importantes colaborações, e à Rafaela de Fátima Neroni, “colega de diazotróficos”, pela amizade, carinho e ótimos momentos juntos. Aos colegas e amigos

de trabalho, Alessandra, Maria Elda, Rafael, Henrique, Leandro, Pilar, Alexandre, Priscila, Mylenne, Vitor, André, Simone, Sandra e a todos os demais colegas de laboratório.

Ao Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, por proporcionar-me os primeiros ensinamentos na ciência e pelo importante treinamento, que foi utilizado neste trabalho. Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa, meu primeiro orientador na graduação, por suas importantes sugestões ao projeto inicial. À Dra. Roseli Wassen, que me ensinou os princípios básicos de Biologia Molecular e forneceu as primeiras orientações em laboratório, conhecimentos utilizados neste trabalho. Ao professor Leonardo Magalhães Cruz pela amizade, importantes orientações e auxílio nas análises das seqüências de DNA e bioinformática; sua colaboração foi essencial para a elaboração deste trabalho.

Ao laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Agrícola, CEBTEC, por meio da professora Helaine Carrer, em permitir e orientar os trabalhos de seqüenciamento de DNA. À técnica Valentina de Fátima De Martin, por toda a atenção despendida e importantes orientações práticas para a execução dos trabalhos. A todos integrantes do laboratório, pela ajuda e agradáveis momentos de convivência.

A Pedro Henrique Santin Brancalion, pelo auxílio na coleta a campo, processamento das amostras e co-autoria do primeiro artigo. À Vivian Scalon, Ana Paula Savassi, Marcelo A. Pinho Ferreira e professor Vinicius Castro Souza, do herbário ESA, e ao Eduardo Meireles e professor Jorge Yoshio Tamashiro, do herbário UNICAMP, pela identificação das plantas.

A todos os colegas e professores da ESALQ, por discussões, convívio e momentos de lazer, em especial ao professor Dr. Márcio Lambais, por importantes sugestões ao projeto inicial, ao professor Dr. Carlos Tadeu Dias dos Santos, por auxílio com a estatística, a Jackson Lange, Magnus Deon, Lucas Azevedo, Carolina Maluche, Adilson, Guillermo, Vinicius e república Taverna, pela amizade e colaborações.

Aos meus amigos Marcel, prof. Adelino Pelissari, Jonas, Miguel Sugai, Kako, Christiano, Adriana, Ane Fernanda, meu padrinho Ervin Fernando, minha avó Genny, meu avô Erno, minha avó Temira, a meus ex-colegas e ex-professores da UFPR e ao escotismo, por importantes lições, apoio e incentivo.

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo provimento de uma bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro aos trabalhos através do subprojeto temático do programa Biota 01/05146-6, "BIODIVERSIDADE VEGETAL E DE ORGANISMOS EDÁFICOS EM ECOSSISTEMAS DE *Araucaria angustifolia* NATURAIS E IMPACTADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO".

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Revisão Bibliográfica.....	12
1.1.1 Florestas de Araucária.....	12
1.1.2 Diversidade de rizóbios.....	18
Referências.....	22
2 DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS E DE OUTRAS BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS EM FLORESTA DE ARAUCÁRIA	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
2.1 Introdução.....	28
2.2 Desenvolvimento.....	29
2.2.1 Material e Métodos.....	29
2.2.2 Resultados.....	31
2.2.3 Discussões.....	38
2.3 Conclusões.....	40
Referências.....	41
3 DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS EM FLORESTA DE ARAUCÁRIA	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
3.1 Introdução.....	45
3.2 Desenvolvimento.....	46
3.2.1 Material e Métodos.....	46
3.2.2 Resultados.....	51
3.2.3 Discussões.....	63
3.3 Conclusões.....	67
Referências.....	68

4 DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM FLORESTAS DE ARAUCÁRIA COM DIFERENTES NÍVEIS DE INTERFERÊNCIA ANTRÓPICA	71
Resumo	71
Abstract	72
4.1 Introdução	73
4.2 Desenvolvimento	74
4.2.1 Material e Métodos	74
4.2.2 Resultados	77
4.2.3 Discussões	85
4.3 Conclusões.....	93
Referências	94
APÊNDICES	97
ANEXOS	101

RESUMO

Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo

Araucaria angustifolia (B.) Ktz é de grande importância sócio-ambiental e econômica, sendo que ecossistemas que abrigam esta espécie foram muito degradados pela atividade antrópica, colocando-a em risco de extinção. O ciclo do nitrogênio é de vital importância para a vida, tendo especial importância no desenvolvimento e manutenção de florestas. A entrada de nitrogênio nestes sistemas é dependente de organismos diazotróficos, em especial dos rizóbios, bactérias do solo que podem formar simbiose com leguminosas e fixar nitrogênio atmosférico. O estudo da diversidade de rizóbios pode favorecer o manejo mais adequado de florestas e muitas técnicas são usadas com este fim, nas quais se destacam o uso de plantas iscas, coleta de nódulos de leguminosas a campo, isolamento das bactérias em meios de cultivo, avaliação fenotípica dos isolados e o sequenciamento do gene 16S rRNA, todas utilizadas neste trabalho. A partir do levantamento de leguminosas no Parque Estadual de Campos do Jordão foram coletadas onze espécies de leguminosas, nove apresentaram nódulos, sendo cinco espécies descritas como nodulantes pela primeira vez. Foram isoladas 212 estirpes de bactérias, havendo variação no formato de nódulos e alta riqueza fenotípica das cepas. Houve variabilidade na diversidade fenotípica de bactérias para cada planta, *Galactia crassifolia* apresentou o maior valor, enquanto que *Mimosa dolens* apresentou o menor. Dos 212 isolados, 55 cepas foram capazes de nodular o feijoeiro e 56 de nodular a bracatinga. Foi sequenciado parcialmente o gene 16S rRNA de 196 estirpes que foram classificadas em oito grupos genotípicos, *Pantoea* sp. (2%), *Pseudomonas* sp. (2%), *Bradyrhizobium* sp1 (10%), *Bradyrhizobium* sp2 (7%), *Rhizobium* sp. (1%), *Burkholderia* sp1 (14%), *Burkholderia* sp2 (26%) e *Burkholderia* sp3 (38%). A análise filogenética mostrou que a maioria dos grupos pertence a gêneros taxonomicamente relacionados a rizóbios. Houve variação na diversidade genotípica das bactérias em relação às plantas das quais foram isoladas, *G. crassifolia* apresentou o maior valor, sendo considerada a mais promíscua, enquanto que *Acacia dealbata* e *M. dolens* apresentaram os menores valores, sendo consideradas as mais específicas. Mostrou-se que o uso de avaliação fenotípica de rizóbios pode ser inadequado, já que os resultados fenotípicos foram muitas vezes divergentes dos genotípicos. Foram comparadas Florestas de Araucária com diferentes níveis de interferência antrópica (Floresta Preservada, Floresta Plantada e Floresta em Regeneração), usando as plantas-iscas caupi, amendoim, soja, bracatinga, maricá e angico. Maricá foi o mais eficiente na captura de rizóbios, enquanto que bracatinga e caupi apresentaram menor eficiência e as demais plantas falharam. Foram isoladas 78 cepas, sendo classificados como pertencentes a seis grupos genotípicos, *Pseudomonas* sp. (3%), *Xanthomonas* sp. (1%), *Ralstonia* sp. (6%), *Herbaspirillum* sp. (4%), *Burkholderia* sp1 (29%) e *Burkholderia* sp3 (57%), sendo três grupos iguais aos caracterizados anteriormente. A maioria destes grupos está relacionada a rizóbios ou bactérias endofíticas conhecidas. A Floresta em Regeneração apresentou maior diversidade de bactérias isoladas, enquanto que as Florestas Plantada e Preservada apresentaram índices semelhantes. β -rizóbios foram predominantes nas Florestas de Araucária estudadas.

Palavras-chave: Floresta Ombrófila Mista; Fixação biológica de nitrogênio; Beta rizóbios; 16S rRNA

ABSTRACT

Rhizobia diversity in Araucaria Forests in São Paulo State, Brazil

Araucaria angustifolia (B.) Ktz has a great social, environmental and economic importance to south and southeastern Brazil, although ecosystems supporting this species have been degraded by human activity, making it an endangered species. The nitrogen cycle has vital importance for life and has a special role in the development and upkeep of forests. The nitrogen input in these systems is dependent on diazotrophic organisms, especially rhizobia, soil bacteria that may nodulate legumes and fix nitrogen in symbiosis with them. The study of rhizobia diversity may support better forest management practices and many techniques are used in these studies, especially the use of trap-plants, field legume nodule collection, bacteria isolation in culture media, phenotypic analysis of the strains and 16S rRNA gene sequencing, all of which were used in this work. From a survey in Campos do Jordão State Park, nine of eleven legume species collected presented nodules, of which five were reported as nodulating for the first time. A total of 212 bacterial strains were isolated from the nodules. There was great variation of nodule shape and great phenotypic richness among isolates. There was variability in the phenotypical diversity of bacteria in each plant, where *Galactia crassifolia* showed the highest value, while *Mimosa dolens* showed the lowest one. Of the 212 strains, 55 were able to nodulate common bean and 56 nodulated bracinga (*M. scabrella*). The 16S rRNA gene of 196 strains were partially sequenced and classified into eight genotypic groups: *Pantoea* sp. (2%), *Pseudomonas* sp. (2%), *Bradyrhizobium* sp1 (10%), *Bradyrhizobium* sp2 (7%), *Rhizobium* sp. (1%), *Burkholderia* sp1 (14%), *Burkholderia* sp2 (26%) and *Burkholderia* sp3 (38%). Phylogenetic analysis showed that most of the groups belong to bacteria genera related to rhizobia. There was variability in the bacterial diversity related to the isolated plants, where *G. crassifolia* showed the highest value, being considered the most promiscuous, while *Acacia dealbata* and *M. dolens* presented the lowest values, and were considered the most specific ones. The phenotypic analysis of rhizobia was shown to be inappropriate for taxonomy, since the phenotypic results were different from the genotypic ones. Araucaria Forests with different levels of human interference (Preserved Forest, Planted Forest and Recovering Forest) were compared using cowpea, peanut, soybean, bracinga, maricá (*M. bimucronata*) and angico (*Parapiptadenia rigida*) as trap-plants. Maricá was the most efficient in rhizobia capture, while bracinga and cowpea showed less efficiency and the others failed. A total of 78 strains were isolated and classified into six genotypic groups: *Pseudomonas* sp. (3%), *Xanthomonas* sp. (1%), *Ralstonia* sp. (6%), *Herbaspirillum* sp. (4%), *Burkholderia* sp1 (29%) and *Burkholderia* sp3 (57%), of which three are the same as previously classified. Most of these groups are related to known rhizobia or other endophytic bacteria. The Recovering Forest showed the highest diversity of isolated bacteria, while Planted Forests and Preserved Forest showed similar indices. β -rhizobia were predominant in the studied areas.

Keywords: Ombrophilous Mixed Forest; Biological nitrogen fixation; Beta rhizobia; 16S rRNA

1 INTRODUÇÃO

A araucária é uma espécie vegetal de grande importância na Floresta Ombrófila Mista, já que suas sementes servem de alimento para inúmeros mamíferos e aves (SANQUETA; TETTO, 1999; ANGELI; STAPE, 2007), além de poder abrigar uma grande comunidade de microrganismos e outros seres vivos. Além desta importância ecológica a araucária possui madeira de boa qualidade, fato que, somado a sua abundância, rendeu a esta árvore o título de principal madeira brasileira até a década de 1970-80 (GUERRA et al., 2002). No entanto, a exploração predatória, somada à expansão de fronteiras agrícolas, resultou na devastação das Florestas de Araucária, colocando-a na lista de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992). Muito esforço tem sido feito no estudo de Florestas de Araucária, ou da espécie individualmente, buscando-se melhor entender o comportamento natural desta planta, assim como técnicas visando regenerar áreas degradadas e aumentar a população desta espécie (SANQUETA; TETTO, 1999; GUERRA et al., 2002).

É conhecida a importância das leguminosas em ecossistemas naturais e o seu uso para exploração econômica ou para recuperação de áreas degradadas (EMBRAPA, 1982; FRANCO; FARIA, 1997; SPRENT, 2001). O principal motivo desta importância está na capacidade de muitas espécies desta família fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com rizóbios, de forma a transformar este nutriente essencial à vida em forma assimilável aos demais organismos vivos.

O plantio de leguminosas em consórcio com a araucária poderá favorecer o desenvolvimento e regeneração destas florestas, contribuindo com aporte de nitrogênio para o sistema. Como a araucária apresenta crescimento lento, o consórcio com outras espécies também poderá favorecer um rendimento econômico mais rápido, devido à exploração do plantio consorciado.

Além da escolha da leguminosa adequada é imprescindível o conhecimento sobre os rizóbios a serem utilizados, já que estas bactérias são fundamentais para que a fixação biológica de nitrogênio ocorra. Sendo assim, o estudo de rizóbios e seu potencial uso em simbiose com espécies de leguminosas pode favorecer a regeneração de Florestas de Araucária.

O estudo da diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária e a seleção de estirpes eficientes para o uso em simbiose com leguminosas é a base para uso do plantio misto de araucária – leguminosas, o que pode gerar ganho em reflorestamentos para fins econômicos ou visando a regeneração de áreas degradadas contendo araucárias.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Florestas de araucária

A araucária

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze possui diversos nomes populares, sendo araucária, pinheiro brasileiro (*Brazil Pine*) e pinheiro-do-Paraná os mais comuns. A araucária é uma gimnosperma, pertencente à família Araucariaceae, sendo que o gênero *Araucaria* compreende 19 espécies (SANQUETA; TETTO, 1999).

A *Araucaria angustifolia* é exclusiva da América do Sul e sua área de ocorrência compreende grande faixa da região sul do Brasil, além de manchas na região sudeste brasileiro e pequenos focos ao leste da Argentina. Ocorre preferencialmente em regiões com altitude entre 500 a 2.300m, podendo também se desenvolver em altitudes mais baixas, apenas em linhas de escoamento de ar frio (GUERRA et al., 2002).

O pinheiro brasileiro é uma espécie característica da Floresta Ombrófila Mista, sendo uma espécie pioneira e heliófila, mas apresenta regeneração natural fraca, sendo que as plântulas não conseguem desenvolver-se no interior das florestas devido à baixa luminosidade. Forma o extrato superior da floresta, apresenta frequência muito variável, mesmo onde é vegetação dominante. A árvore é longeva, atingindo, em média, de 140 a 250 anos de idade, baseando-se nos anéis de crescimento, mas pode atingir mais de 300 anos de idade (SANQUETA; TETTO, 1999).

Na forma juvenil apresenta forma cônica, semelhante a outros pinheiros, como o *Pinus*, no entanto apresenta forma típica quando adulto, lembrando um formato de

“taça”. Pode chegar a 50 metros de altura, apresentando altura média de 20-30 metros quando adulto. Apresenta madeira de densidade média (0,55), composta de fibras longas, que pode formar tábuas e vigas de grande comprimento e boa resistência, fatores estes que trazem atrativos para seu uso madeireiro. Quando em abundância, sua madeira foi utilizada para a construção de embarcações, havendo relatos de construção de caravelas portuguesas, e na construção de casas dos colonizadores da região sul do Brasil. Na fase áurea de exploração, ou devastação, a madeira teve inúmeros usos, destacando-se a exportação, sendo usada especialmente para confecção de móveis e escadas e para uso no mercado interno para indústria de celulose, fábrica de fósforos, fabricação de caixas, lenha, combustível de caldeira de locomotivas e embarcações, etc. O uso pela indústria de celulose merece destaque, já que as fibras longas permitem a confecção de tipos especiais de papel, assim como, sua coloração clara reduz a necessidade de aditivos químicos clareadores, havendo até hoje este uso industrial (BANDEL, 1966; MATTOS, 1972; SANQUETA; TETTO, 1999; GUERRA et al., 2002; ANGELI; STAPE, 2007).

O Pinheiro-do-Paraná é uma planta dióica, apresentando indivíduos machos e fêmeas, levando em média de 18-25 anos para atingir a fase reprodutiva. O estróbilo feminino, chamado popularmente de pinha, leva cerca de 2 anos para ser formado e dá origem às sementes, denominadas pinhões (BANDEL, 1966). Os pinhões possuem bom valor nutricional, o que os torna atrativo para predação por inúmeros animais, incluindo aves, mamíferos e insetos, sendo utilizado inclusive para alimentação humana. Esta demanda favorece a dispersão de sementes, o que gerou inúmeras crendices populares na região sul, como o caso da lenda da gralha azul. Como a gralha azul era constantemente observada nos pinheiros, popularizou-se a crença de que a gralha azul seria a semeadora da araucária. Atualmente sabe-se que a principal dispersão natural da araucária é dada por mamíferos, destacando-se a cutia. Ouriços, pacas, camundongos, esquilos e diversas aves também se alimentam e colaboram na dispersão de sementes de araucária (ANGELI; STAPE, 2007), servindo de exemplo das importantes relações ecológicas desta árvore com a fauna. Como alimentação humana, os pinhões eram muito utilizados pelos índios, havendo também relatos do uso como principal alimento por colonizadores do Paraná (SANQUETA; TETTO, 1999).

Atualmente é um prato típico da região sul do país, havendo inúmeras receitas regionais, além de haver grande procura, especialmente no período das festas juninas. O pinhão e o nó de pinho podem ser utilizados como matéria prima para a confecção de artesanatos e esculturas (ANGELI; STAPE, 2007). Estes fatos tornam o pinhão um produto de interesse econômico, ainda essencialmente extrativista, que, no entanto, pode apresentar boa rentabilidade em reflorestamentos, podendo superar inclusive o valor proporcional à extração de madeira (GUERRA et al., 1999).

Devido à exploração predatória da madeira desde o começo do século XX, expansão de novas fronteiras agrícolas e à baixa regeneração natural, a *Araucaria angustifolia* foi incluída na lista da FAO de espécies que necessitam de atenção e na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992). Atualmente estima-se que exista apenas 1% da população de araucária que existia antes da colonização do país pelos portugueses, sendo que cerca de 90% da devastação ocorreu no último século, principalmente devido ao desmatamento gerado pela expansão de fronteiras agrícolas (SANQUETA; TETTO, 1999).

Com o intuito de preservar a araucária, foram criadas leis regulamentando o seu corte, assim como, estabelecendo-se alguns parques de preservação de Florestas de Araucária. No entanto, há pouco incentivo para o plantio da araucária e, apesar de existir um bom potencial de retorno econômico (AQUINO, 2005), as indústrias madeireiras preferem o investimento em plantas de crescimento mais rápido, como o Pinus e o Eucalipto. Incentivos fiscais e governamentais poderiam reverter esta situação, favorecendo o aumento da área de *A. angustifolia* no país (GUERRA et al., 2002). Este problema foi iniciado na década de 60 quando as áreas de araucária estavam sendo exploradas indiscriminadamente e surgiu a necessidade de reflorestamento. Devido à política inadequada da época foi dada preferência ao reflorestamento de espécies exóticas, ao invés do reflorestamento de espécies nativas (SANQUETA; TETTO, 1999).

Existe divergência quanto ao uso da terminologia “Floresta de Araucária” ou “Floresta com Araucária”, para florestas que contenham *A. angustifolia*, sendo que oficialmente o IBGE utiliza a terminologia Floresta de Araucária como sinônimo de Floresta Ombrófila Mista (IBGE, 1992). Devido aos reflorestamentos de araucária, a

partir da década de 1960, o termo Floresta de Araucária também começou a ser usado com este fim. No presente trabalho utiliza-se o termo “Floresta de Araucária” referindo-se a florestas nativas, plantadas ou reflorestadas contendo *A. angustifolia*.

Floresta Ombrófila Mista

O termo “Ombrófila” é de origem grega que significa “amigo das chuvas” e florestas deste tipo são também conhecidas como “Mata Atlântica” (*stricto sensu*), fazendo parte assim do Domínio da Mata Atlântica (GUERRA et al., 2002). Pelo sistema de classificação da vegetação brasileira, este tipo de vegetação segue a seguinte hierarquia: Zona Neotropical, Classe de Formação Florestal, Subclasse de Formação Ombrófila, Grupo de formação Higrófito, podendo ser dos subgrupos de formação Densa, Aberta ou Mista (IBGE, 1992).

A Floresta Ombrófila Mista, sendo um sub-tipo desta vegetação, é considerada um tipo de vegetação do Planalto Meridional, sendo esta área considerada como “clímax climático”. Apresenta disjunções florísticas em refúgios situados nas Serras do Mar e da Mantiqueira (IBGE, 1992).

A Floresta Ombrófila Mista pode ser dividida em (IBGE, 1992):

- Aluvial, em terraços antigos situados ao longo dos flúvios.
- Submontana, de 50 até mais ou menos 400 m de altitude.
- Montana, de 400 até mais ou menos 1000 m de altitude.
- Alto-montana, quando situadas a mais de 1000 m de altitude.

A principal característica da Floresta Ombrófila Mista é a presença da araucária, em geral associada às famílias Lauraceae, Myrtaceae e Rubiaceae, podendo ter uma significativa população da gimnosperma *Podocarpus lambertii* Klotz., quando em altitudes elevadas (IBGE, 1992).

Apesar de espécies da família Fabaceae (popularmente chamadas de leguminosas) não serem abundantes em Floresta de Araucária, em momentos de perturbação ambiental podem aparecer, já que muitas espécies desta família são consideradas como plantas pioneiras, estando presentes no banco de sementes dos solos. Neste contexto a leguminosa bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) merece

destaque, pois apresenta rápido crescimento inicial e bom potencial de fixação biológica de nitrogênio (CARVALHO, 2007).

Florestas de Araucária no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo a araucária está na categoria das espécies denominadas como criticamente em perigo de extinção. Neste estado, os pinheiros ocorrem em certas regiões distintas entre si. Ao sul, a área de ocorrência desta conífera está limitada pela divisa com o Estado do Paraná, de Itararé para leste, até cerca de Apiaí. Seguindo para o norte, a oeste da Serra de Paranapiacaba, em direção a Capão Bonito e Buri, ocorre uma faixa estreita que passa pela esquerda de Ribeirão Branco. Nos arredores de São Paulo, passando por Mogi das Cruzes, Paraibuna e Bocaina e, ainda, pelo leste do estado, encontra-se a araucária. Ocupava grande parte da Serra da Mantiqueira, mas atualmente existem somente dois maciços no estado, ou seja, áreas ainda preservadas, uma localizada no Parque Estadual de Campos do Jordão, município de Campos do Jordão e outra no Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira, no município de Apiaí (CARDOSO et al., 2004).

Nitrogênio, leguminosas e rizóbios

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para os organismos vivos, constituinte de importantes moléculas, como aminoácidos e ácidos nucléicos, e a ciclagem deste elemento dentro dos ecossistemas é de vital importância para a sobrevivência e manutenção da vida. O nitrogênio presente nos ecossistemas é proveniente direta ou indiretamente do N_2 atmosférico, o qual não pode ser assimilado diretamente pelos organismos vivos, com exceção dos organismos diazotróficos. Para que o N_2 atmosférico seja incorporado aos ecossistemas é necessário que seja transformado, ou seja, fixado em forma absorvível pelos demais organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fixação e incorporação de N nos sistemas pode ser dada por três formas principais, a incorporação por chuva, sendo que a fixação do N ocorre por descargas

elétricas (raios e relâmpagos); fixação artificial, realizada pelo homem através da produção de fertilizantes para fins principalmente agrícolas; e o mais importante em termos globais e de desenvolvimento na vida da terra, que é a fixação biológica, realizada por bactérias diazotróficas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Dentre as bactérias diazotróficas as mais estudadas pelo homem e que, aparentemente, possuem maior eficiência e importância quanto à fixação de nitrogênio são os rizóbios (SPRENT, 2001). Estes microrganismos, pertencentes ao filo Proteobacteria do domínio Bacteria, realizam simbiose com plantas da família Fabaceae, formando uma estrutura chamada nódulo, no qual ocorre a fixação biológica de nitrogênio.

O uso deste processo em sistemas agrosilvipastoris pode trazer vantagem econômica, que se dá pela redução ou isenção da aplicação de fertilizantes nitrogenados no plantio e cultivo das plantas. Um bom exemplo é aquele obtido no cultivo da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), onde a inoculação por *Bradyrhizobium sp.* resulta em suprimento adequado de nitrogênio para a cultura e reduções significativas nos custos de produção em relação ao suprimento químico por fertilizantes. Estima-se que no Brasil ocorra a economia de 2 bilhões de reais devido ao uso desta tecnologia (FURTADO, 2007), considerando-se apenas a cultura da soja!

Em ecossistemas naturais a fixação biológica de nitrogênio apresenta grande importância, em especial a realizada por rizóbios em simbiose com leguminosas, estando inclusive relacionada à sustentabilidade de florestas (FRANCO; FARIA, 1997; ZAHRAN, 2001).

As Florestas de Araucária podem apresentar em sua composição algumas espécies de leguminosas florestais que merecem destaque, como o caso da bracatinga (*Mimosa scabrella*), o angico (*Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan) e ingá (*Inga sessilis* (Vellozo) Martius), que, além de fixar nitrogênio, apresentam interesse para a silvicultura (CARVALHO, 2007).

Sendo assim, o estudo das leguminosas, da ocorrência de nodulação e da diversidade de rizóbios pode colaborar com um melhor entendimento do ciclo do nitrogênio em Florestas de Araucária e servir de base para melhores práticas de manejo

destas florestas, para a recuperação de áreas degradadas ou para plantios com fins comerciais.

1.1.2 Diversidade de rizóbios

Importância

Durante o Renascimento iniciaram-se os estudos de nutrição de plantas e foi constatado que algumas leguminosas utilizavam mais nitrogênio do que o solo poderia oferecer, sugerindo que elas utilizavam o nitrogênio atmosférico para seu crescimento, destacando-se os trabalhos de Liebig no século XIX. No final do mesmo século, Beijerinck isolou bactérias a partir de nódulos de leguminosas, sugerindo que fossem responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico nas plantas. Posteriormente foram chamadas de *Rhizobium* (vida na raiz), sendo depois separados em diversos gêneros, no entanto sendo popularmente chamadas de rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido ao grande potencial do uso destas bactérias como supridoras de nitrogênio às plantas, este é o grupo de procariotos mais estudado, após os grupos patogênicos ou de potencial industrial. Os estudos podem ser divididos em estudos da interação planta-bactéria, estudos de diversidade e estudos de aplicação. Os estudos de diversidade são os trabalhos básicos para o isolamento de novas estirpes e caracterização de novas simbioses entre rizóbios e leguminosas, especialmente porque apenas cerca de 30% destas plantas foram estudadas quanto à nodulação (SPRENT, 2001). Os demais trabalhos referem-se ao entendimento de como funciona o mecanismo da interação rizóbio-leguminosa, e a potencialização do uso desta simbiose para a agricultura, silvicultura e recuperação de áreas degradadas.

Diversidade e taxonomia de procariotos

A diversidade é composta de dois componentes, o primeiro é o número de espécies (denominado também de riqueza) e o segundo a abundância relativa das espécies (MAGURRAN, 1988). Segundo o mesmo autor, existem divergências quanto

ao uso do termo diversidade. Os estatísticos defendem o uso de índices, sendo muito utilizado o índice de Shannon. Não existe, porém, consenso quanto a uma padronização no uso dos diferentes índices de diversidade.

Somada a esta indefinição, nos últimos anos, devido à maior preocupação da sociedade por questões ambientais, ocorreu uma grande mobilização de estudos de identificação de organismos em diferentes regiões do mundo. Dentro deste contexto tornou-se popular, pela sociedade e pela ciência, o uso do termo biodiversidade para qualquer estudo que identificasse organismos vivos em determinadas áreas, independente da avaliação da variabilidade destes dados e da utilização de índices.

O estudo de diversidade de procariotos é ainda mais complexo, já que o conceito de espécie ainda não foi estabelecido adequadamente para este reino (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; COHAN, 2002; GEVERS et al., 2005). No conceito clássico de espécies, estas são delimitadas por grupos de organismos que evoluíram separadamente de outros, possuindo características próprias, mudanças irreversíveis em relação ao ancestral e capacidade de se reproduzir com indivíduos da mesma espécie, gerando descendentes férteis. Nos eucariotos recombinações genéticas podem ocorrer apenas entre indivíduos de uma mesma espécie, e, em alguns casos, dentro do mesmo gênero, no entanto com taxa de recombinação limitada. A possibilidade de troca genética em bactérias, especialmente por transferência horizontal, pode resultar em mudanças de até 30% no genoma do organismo, podendo ocorrer mesmo entre bactérias de diferentes filos, trazendo profundas mudanças evolutivas (COHAN, 2002). Desta forma, fica difícil para a ciência denominar que tipos de características seriam necessárias para limitar as espécies em procariotos.

Inicialmente a taxonomia de bactérias era dada por atributos fenotípicos dos isolados, especialmente através de aspectos morfológicos e fisiológicos das colônias formadas, utilização de fontes de carbono, etc. Frente às características peculiares destes seres, acima descritas, novas metodologias começaram a ser adotadas, sendo que a comparação DNA-DNA de bactérias assumiu grande importância na delimitação de espécies, onde a técnica de hibridização recebeu grande atenção (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; GEVERS et al., 2005). Além da técnica de hibridização DNA-DNA ser muito dispendiosa, os resultados obtidos não podem ser comparados em

trabalhos de diferentes pesquisadores. Esforços foram feitos de forma a buscar técnicas com as quais pudessem ser formados bancos de dados, e que permitissem comparações de dados de diferentes pesquisadores. Foi com o seqüenciamento de DNA que esta premissa pôde ser alcançada, sendo necessário encontrar genes conservados entre os organismos. O ribossomo de procariotos foi o maior achado da ciência, até então, para o estudo de filogenia e evolução, já que a molécula apresenta regiões conservadas e algumas regiões variadas, tendo como grande vantagem uma taxa de mutação proporcional à evolução dos organismos, o que aparentemente não ocorre em eucariotos (WUYTS et al., 2001). Este fato rendeu à molécula o nome de “relógio evolucionário”. A estrutura central do ribossomo de procariotos é constituído de três sub-unidades, codificadas a partir dos genes 5S rRNA, 16S rRNA, e 23S rRNA, sendo mais popular os estudos envolvendo o segundo gene. As subunidades 16S e 23S do ribossomo também podem ser denominadas como SSU (*Small Ribosomal Subunit*, “subunidade pequena do ribossomo”) e LSU (*Large Ribosomal Subunit*, “subunidade grande do ribossomo”), respectivamente.

O gene 16S rRNA possui cerca de 1600 pares de base, que são predominantes nos bancos de dados mundiais, havendo correntes de pesquisadores que defendem o uso destas seqüências para o estabelecimento de conceitos taxonômicos em procariotos, como o “Ribosomal Database Project” - RDPII (COLE et al., 2005). Esta técnica se mostrou muito confiável para a separação de gêneros de bactérias, sendo aceito o limite de 97% de similaridade para a separação de espécies, mas sugerido o uso de diversos genes (MLSA – *Multi Locus Sequence Analysis*, ou “análise de seqüências multilocus”), quando necessária uma maior resolução taxonômica (GEVERS et al., 2005).

Estudos com rizóbios

Com o advento da Biologia Molecular surgiram inúmeras metodologias capazes de identificar bactérias no solo sem a necessidade de isolá-las. O princípio básico deste método envolve a extração do DNA do solo seguido de amplificação de uma região conservada do genoma, em geral o gene 16S rRNA, por PCR. No entanto, esta

metodologia é restrita às seqüências já presentes em bancos de dados, sendo recomendado o isolamento das bactérias para uma correta caracterização (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

Devido à característica dos rizóbios formarem nódulos em leguminosas, em geral, os rizóbios são isolados a partir destas estruturas. A coleta de nódulos pode ser realizada diretamente a campo, através da identificação das leguminosas e escavação ao redor da planta, buscando-se as raízes e nódulos, ou através da utilização de plantas-iscas. Plantas-iscas são leguminosas promíscuas utilizadas para capturar rizóbios, utilizando-se a simbiose entre estes organismos como forma de selecionar os rizóbios presentes em amostras de solo a serem analisadas.

Devido ao intenso trabalho de isolamento de rizóbios para a utilização como biofertilizantes, grandes bancos de estirpes foram constituídos; estas bactérias em geral foram classificadas por meio de características de cultivo ou eficiência simbiótica, sendo muitas agora estudadas quanto à diversidade genotípica (MENNA et al., 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas para estudos de diversidade de rizóbios destacam-se a caracterização fenotípica, baseada em características culturais ou a genotípica, baseada em técnicas moleculares. Quanto à caracterização fenotípica destaca-se a avaliação da mudança de pH do meio de cultivo, velocidade de crescimento e cor das colônias, podendo haver interesse em tolerância a antibióticos, salinidade ou outras características culturais (ODEE et al., 1997, MOHAMED et al., 2000, MELLONI et al., 2006). Quanto à caracterização genética, existe uma grande variabilidade de técnicas, sendo que a maioria envolve o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), como a amplificação de regiões repetitivas dentro do genoma de rizóbios, por exemplo, REP, ERIC e BOX PCR, ou a amplificação de genes conservados, como os genes nod (nodulação), nif (fixação de nitrogênio) e, destacando-se, o gene 16S rRNA. Após a amplificação os fragmentos podem ser digeridos com enzimas de restrição, como as técnicas ARDRA e RLFP, ou podem ser seqüenciados, sendo comum a combinação de técnicas (MOREIRA; YOUNG; HAUKKA, 1998; ODEE et al., 2002; CHEN et al., 2003; MUTCH et al., 2003; YOUNG, 2004; McINNIS et al., 2004; KASCHUCK et al., 2005; MENNA et al., 2006).

Dentre todas estas técnicas, as que utilizam o seqüenciamento têm apresentado grande destaque, já que os dados podem ser submetidos a bancos de dados mundiais, permitindo comparação de resultados de pesquisadores de todo o mundo. Ao mesmo tempo estas seqüências podem ser re-analisados conforme o banco de dados aumenta, possibilitando atualização filogenética dos trabalhos (YOUNG, 2004). Além disso, esta técnica vem trazendo profundas mudanças na taxonomia de rizóbios (SPRENT, 2001).

Inicialmente, baseado principalmente em atributos fenotípicos, acreditava-se que os rizóbios pertenciam exclusivamente ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, sub-classe Alfaproteobacteria, ordem Rhizobiales (SPRENT, 2001). Recentemente, utilizando-se o seqüenciamento do gene 16S rRNA, foi mostrado que bactérias da sub-classe Betaproteobacteria também são capazes de formar nódulos em leguminosas (MOULIN et al. 2001, CHEN et al., 2003), surgindo os termos α -rizóbios e β -rizóbios para separação de bactérias pertencentes às sub-classes Alfaproteobacteria e Betaproteobacteria, respectivamente.

Com a popularização do seqüenciamento genômico e a grande versatilidade desta técnica, existe uma forte tendência para que a utilização de seqüências do gene 16S rRNA seja futuramente padrão no estudo de diversidade rizóbios.

Referências

ANGELI, A.; STAPE, J. L. ***Araucaria angustifolia* (Araucária)**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/a.angustifolia.asp>>. Acesso em: 23 fev. 2007.

AQUINO, F. M. de. **Cultivo da araucaria angustifolia**: análise de viabilidade econômico-financeira. Florianópolis: BRDE, 2005. 53 p.

BANDEL, G. **O pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Piracicaba: ESALQ, 1966. 66 p.

BRASIL. Portaria nº 6-N, de 15 de janeiro de 1992. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, 23 jan. 1992. p. 870-872.

CARDOSO E. J. B. N; LAMBAIS, M. R.; RODRIGUES, R. R.; TSAI, S. M. **Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no estado de São Paulo**. Piracicaba: ESALQ; 2004. 23p. Projeto temático versão equipe processo FAPESP 01/05146-6

CARVALHO, P. E. R. **ESPÉCIES FLORESTAIS BRASILEIRAS**: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm>. Acesso em: 23 fev 2007.

CHEN, W. M.; MOULIN, L; BONTEMPS, C; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVNI-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, Dec. 2003.

COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p 457-487, Oct. 2002.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, D. M; McGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 294-296, Jan. 2005.

EMBRAPA. 7., Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade econômica dos reflorestamentos. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS. 1982. Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1982. p. 33-52.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N_2 -fixing tree legumes to le reclamation e sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.29, n. 5/6, p. 897-903, May 1997.

FURTADO, R. **A pesquisa que revolucionou a agricultura**. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/sciam/conteudo/materia/materia_42.html>. Acesso 23 fev. 2007.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS M. S. dos; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Ed.). **Sustentável Mata Atlântica**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-101.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; PEER, Y. Van de; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 733-739, Sep. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. 92p. (Série Manuais Técnicos em Geociências, 1).

KASCHUK, G. ; HUNGRIA, M. ; ANDRADE, D. S. ; CAMPO, R. J. . Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional system in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Columbus, v. 32, p. 210-220, Jan. 2006.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: sn, 1972. 618 p.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179p.

McINNES, A.; THIES, J. E.; ABBOT, L. K.; HOWIESON, J.G. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities – a review. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.36, p.1295-1308, Aug. 2004.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.235-246, Mar./Abr. 2006.

MENNA, P. ; HUNGRIA, M. ; BARCELLOS, F. G. ; BANGEL, E. V. ; HESS, P. N. ; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 315-332, Jun. 2006.

MOHAMED, S.H., SMOUNI, A., NEYRA, M., KHARCHAF, D., FILALI-MALTOUF, A. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.224, p.171-183, Sep. 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, London, v. 7, p. 889-895, Jul. 1998.

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

MUTCH, L.A.; TAMIMI, S.M.; YOUNG, J.P.W. Genotypic characterization of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.35, n. 5, p. 709-714, May 2003

ODEE, D.W.; SUTHERLE, J.M.; MAKATIANI, E.T.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I. Phenotypic characteristics e composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, n. 1, p.65-75, Jan. 1997.

ODEE, D. W.; HAUKKA, K.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M.; YOUNG J. P. W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 34, n. 6, p. 801-811, Jun. 2002.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Delft, v. 25, n. p. 39 -67, Jan. 2001.

SANQUETA, C. R.; TETTO, A. F. **Pinheiro-do-Paraná**: Lendas e realidades. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1999. 112 p.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146 p.

ZAHARAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 143-153, Oct. 2001.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; WEIR, S. B. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 238, n. 1, p. 125–131, Sep. 2004.

WUYTS, J.; PEER, Y. Van de; WACHTER, R. De. Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 24, p. 5017-5028, Dec. 2001.

2 DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE RIZÓBIOS E DE OUTRAS BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS EM FLORESTA DE ARAUCÁRIA

Resumo

A Floresta de Araucária é uma formação florestal em nível crítico de conservação, sendo a araucária uma espécie em risco de extinção. Florestas de Araucária nativas são classificadas como um subtipo de “Mata Atlântica”, ocorrendo em comunidades mistas de plantas, incluindo muitas espécies de leguminosas. Estas plantas podem formar nódulos e fixar nitrogênio atmosférico, contribuindo para a sustentabilidade das florestas. Este trabalho objetivou o levantamento de leguminosas no Parque Estadual de Campos do Jordão e o isolamento de bactérias dos nódulos radiculares destas plantas, seguido da caracterização fenotípica dos isolados. As bactérias dos nódulos foram isoladas em meio de cultura YMA, sendo classificadas de acordo com suas características de crescimento (velocidade de crescimento, cor, produção de polissacarídeo extracelular e mudança de pH do meio). Os dados foram analisados por análise de agrupamento e análise de componentes principais (PCA). A diversidade de bactérias no nódulo de cada planta foi calculada através do índice de Shannon, o que permitiu comparar a homologia, especificidade ou promiscuidade, de cada planta em relação às bactérias isoladas. De um total de onze espécies de leguminosas, nove apresentaram nódulos, sendo cinco espécies descritas como nodulantes pela primeira vez. Duzentos e doze estirpes de bactérias foram isoladas, havendo variação no formato de nódulos e alta riqueza fenotípica das bactérias isoladas. Essa riqueza ocorreu na comparação entre as espécies de leguminosas, entre indivíduos da mesma espécie, entre diferentes formatos de nódulos e, inclusive, entre bactérias isoladas de um mesmo nódulo. As bactérias puderam ser classificadas em vários grupos, de dois a seis, de acordo com cada leguminosa, a maioria deles diferentes de *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Burkholderia sp.*, que foram utilizados como padrões de crescimento. Houve variabilidade nos índices de diversidade calculados para cada planta, sendo que *G. crassifolia* apresentou o maior valor, sendo a mais promíscua, enquanto que *M. dolens* apresentou o menor valor, sendo a mais específica.

Palavras-chave: Floresta Ombrófila Mista; Fixação biológica de nitrogênio; Bactérias simbióticas

Rhizobia and other legume nodule bacteria phenotypic diversity in Brazilian Araucaria Forest

Abstract

The Araucaria Forest is a sub-type of the Atlantic Forest, dominated by *Araucaria angustifolia*, which is considered an endangered species. The understory has a high diversity of plant species, including several legumes. Many leguminous plants nodulate with rhizobia and fix atmospheric nitrogen, contributing to forest sustainability. This work aimed at bacteria isolation and phenotypic characterization from the root nodules of legumes occurring in Araucaria Forest, at Campos do Jordão State Park, Brazil. Nodule bacteria were isolated in YMA culture media and the colonies obtained were classified according to their growth characteristics (growth rate, color, extra cellular polysaccharide production and pH change of the media). Data was analyzed by cluster and principal component analysis (PCA). The bacterial diversity in legume nodules of each plant was calculated using the Shannon index, permitting to compare the homology (specificity or promiscuity) of each plant in relation to its isolated bacteria. Nine of eleven legume species collected presented nodules, of which five were reported as nodulating for the first time in the literature. Two hundred and twelve bacterial strains were isolated from the nodules, whose shapes varied widely and there was a great phenotypic richness among isolates. This richness was found when comparing legume species, individuals of the same species, different nodule shapes and even among isolates of the same nodule. These isolates were classified into several groups, from two to six, depending on each legume. Most of the isolates differed from the growth standards *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium elkanii* and *Burkholderia* sp. There was variability in the diversity indices calculated for each plant, where *G. crassifolia* showed the highest value, being the most promiscuous, and *M. dolens* showed the lowest value, being the most specific.

Keywords: Ombrophilous Mixed Forest; Biological nitrogen fixation; Symbiotic bacteria

2.1 Introdução

A Floresta de Araucária, que é caracterizada pela presença do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*, (Bert.) O. Kuntze), uma Gimnosperma, é distribuída pelas regiões de clima subtropical, principalmente nos estados do sul do Brasil. A Floresta de Araucária é um subtipo de Mata Atlântica, sendo também chamada de Floresta Ombrófila Mista.

Sendo uma floresta subtropical, diferente das outras florestas tropicais encontradas no país, ela contém muitas plantas endêmicas, incluindo leguminosas (ROBIM et al., 1990; IBGE, 1992; RODERJAN et al., 1998), que toleram temperaturas abaixo de 0 °C nos meses mais frios. Esta vegetação específica e as condições climáticas podem também ter contribuído para o desenvolvimento de uma comunidade microbiana específica. Um melhor entendimento desta microbiota pode ser essencial para um manejo adequado desta floresta, já que a araucária é considerada uma planta em extinção (BRASIL, 1992).

Rizóbios são bactérias que podem fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas, suprimindo parte da entrada de nitrogênio para as florestas (FRANCO; FARIA, 1997; SPRENT, 2001). Os rizóbios podem estar associados a outras bactérias nos nódulos de leguminosas, sendo que todos podem apresentar um papel de relevância em Florestas de Araucária. Um estudo mais detalhado pode suportar práticas de manejo mais adequadas.

O Parque Estadual de Campos do Jordão possui um dos últimos refúgios de Florestas de Araucária preservadas, onde podem ser encontradas florestas nativas, plantadas e em regeneração. Poucos trabalhos se dedicaram ao estudo da composição florística e nada é conhecido sobre a ocorrência de rizóbios e outras bactérias de nódulos neste parque.

Os objetivos deste estudo foram: 1) coletar leguminosas e nódulos 2) isolar bactérias destes nódulos e testar a riqueza fenotípica dos isolados 3) agrupar as bactérias utilizando suas características fenotípicas 4) testar a diversidade de grupos bacterianos entre as leguminosas encontradas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Amostragem

Leguminosas e nódulos foram coletados em julho de 2006 no Parque Estadual de Campos do Jordão, na cidade de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, na Serra da Mantiqueira (22°45' S e 45°30' W).

A altitude média é de 1450 m, sendo que algumas regiões podem ultrapassar 2000 m. A região possui o clima Cfb, classificação de Köppen, de acordo com Seibert et al. (1975), ou seja, clima subtropical de altitude, mesotérmico e úmido, sem período seco. A precipitação média anual é de 2000 mm, a qual é relativamente bem distribuída ao longo do ano. Julho é o mês mais frio, quando a temperatura pode chegar a -7,2 °C (SEIBERT et al., 1975).

A coleta foi realizada em diversos sítios ecológicos do parque associados a araucárias, onde espécies de leguminosas foram procuradas através de caminhar aleatório pelo parque. Quando encontradas foram coletados ramos vegetativos e, quando presente, material reprodutivo, sendo etiquetados para posterior identificação. Amostras de raízes contendo nódulos foram obtidas cavando-se ao redor das plantas, tendo-se o cuidado de checar se estavam conectados à planta amostrada. Ao longo da coleta, raízes e nódulos foram mantidos em caixas térmicas com gelo até o transporte ao laboratório, onde foram mantidas em refrigerador a 4 °C.

Os nódulos foram separados das raízes no laboratório, onde foi realizado o isolamento das bactérias e sua caracterização fenotípica. Os nódulos foram registrados por uma câmera digital conectada a um estéreo microscópio.

Identificação das leguminosas

As espécies de leguminosas foram identificadas por especialistas do Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Herbário ESA), onde as amostras foram depositadas, e por especialistas do Herbário da UNICAMP.

Isolamento de bactérias e caracterização fenotípica

Os nódulos foram desinfestados por trinta segundos em álcool 95% e por um minuto em hipoclorito de sódio 6%, adaptado de Barrett e Parker (2006). Foram então lavados quatro vezes em água destilada e esmagados com um bastão de vidro flambado em 500 µl de água. Cerca de 10 µl desta suspensão foram transferidos com uma alça de platina flambada para uma placa de Petri contendo o meio de cultivo YMA (VINCENT, 1970) que foi incubada no escuro a 28 °C por até 14 dias. Colônias típicas e bem isoladas foram repicadas para o meio diagnóstico, adaptado de Odee et al. (1997):

- (a) tubos de ensaio contendo meio líquido YM (YMA sem ágar) com 25 mg l⁻¹ de azul de bromotimol como indicador de pH;

- (b) Placas de Petri contendo YMA com 25 mg l⁻¹ de vermelho congo.

As bactérias inoculadas em meio líquido foram incubadas a 28 °C, em agitador (220 rpm), no escuro e classificadas de acordo com a mudança de pH do meio (alcalino, neutro ou ácido).

Placas de Petri foram incubadas a 28 °C, no escuro até as colônias serem avaliadas, sendo caracterizadas de acordo com a cor (branca, rosa, translúcida, amarela ou branca com o centro rosa), com a quantidade de polissacarídeo extra celular (EPS) produzido (nenhum a moderado ou moderado a abundante) e tamanho da colônia (diâmetro medido com uma régua, após 3, 6 ou 8 dias de incubação).

Foram feitas três repetições para cada isolado analisado e a média de crescimento foi usada para separar as diferentes categorias (adaptado de Odee et. al., 1997):

- (a) muito rápido – colônias ≥ 5 mm de diâmetro após 3 dias de incubação.

- (b) rápido – colônias ≥ 3 mm de diâmetro após 3 dias de incubação.

- (c) intermediário – colônias ≥ 3 mm de diâmetro após 6 dias de incubação.

- (d) lento – colônias ≥ 3 mm de diâmetro após 8 dias de incubação.

(a) muito lento – colônias ≤ 3 mm de diâmetro após 8 dias de incubação.

Cor e EPS foram avaliados apenas quando as colônias atingiram o tamanho mínimo de 3 mm, com exceção das de crescimento muito lento, que não atingiram este tamanho quando foram avaliadas no oitavo dia.

Bradyrhizobium elkanii SEMIA 5019, *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, e *Burkholderia sp.* Br 3407 foram usados como padrões de crescimento bacteriano, sendo cultivados nas mesmas condições.

Análises estatística

A riqueza das bactérias foi analisada pelo “*biplo*” da análise de componentes principais (LEPS; SMILAUER, 2003) e as bactérias agrupadas por uma análise de agrupamento utilizando o método de ligação média e distância Euclidiana, usando como linha de separação 0,75 (adaptado de MELLONI et. al, 2006) e, a partir destes grupos calculado o índice de diversidade de Shannon, H, e equivalência de Shannon, J (MAGURRAN, 1988). Os dados utilizados para a realização das análises foram: taxa de crescimento (1 - muito rápido, 2 - rápido, 3 - intermediário, 4 - lento e 5 - muito lento), mudança de pH do meio (1 - ácido, 2 - neutro e 3 - alcalino), cor (1 - translúcida, 2 - branca, 3 - branca com o centro rosa, 4 - rosa e 5-amarelo) e EPS (1 - nenhum a moderado e 2 - moderado a abundante).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o programa CANOCO e o “*biplo*” usando o programa CANODRAW (LEPS; SMILAUER, 2003). Análise de agrupamento foi realizada utilizando o programa SAS (SAS, 2002).

2.2.2 Resultados

Leguminosas, nódulos e bactérias isoladas

Duas Fabaceae-Faboideae e sete Fabaceae-Mimosoideae, todas espécies contendo nódulos, foram coletadas e apresentaram diferentes formatos de nódulos nas

raízes. Duas outras espécies de Fabaceae-Mimosoideae foram coletadas, mas não apresentaram nódulos (Tabela 2.1, Apêndice A).

Tabela 2.1 – Leguminosas com diferentes hábitos de crescimento (HC) coletadas em diferentes sítios ecológicos no Parque Estadual de Campos do Jordão e seus formatos de nódulos

Espécies	HC	Sítio de Coleta	Formato dos Nódulos
<u>Fabaceae-Faboideae</u>			
<i>Galactia crassifolia</i> (Benth.) Taub.	sub-arbustivo	campinas de montanha	esférico
<i>Collaea speciosa</i> (Loisel.) DC.	sub-arbustivo	borda de floresta em regeneração	esférico, bastonete
<u>Fabaceae-Mimosoideae</u>			
<i>Acacia dealbata</i> (Link) F.J.Muell	arbóreo	mata ciliar plantada	esférico, bastão
<i>Mimosa dolens</i> Vell. var. <i>acerba</i> (Benth.) Barneby	arbustivo	floresta em regeneração	esférico, bastão
<i>Mimosa filipetiola</i> Burkart	trepadeira	floresta em regeneração	bastão, coralóide
<i>Mimosa furfuracea</i> Benth.	arbustivo	mata ciliar	bastão, amorfo
<i>Mimosa pilulifera</i> Benth. var. <i>pseudincana</i> (Burkart) Barneby	arbustivo	floresta em regeneração	forma de leque e aglomerado
<i>Mimosa monticola</i> Dusen.	arbustivo	floresta em regeneração	sem nódulos
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	arbóreo	floresta preservada e mata ciliar	esférico, bastão e forma de leque
<i>Mimosa</i> sp. 1	arbustivo	floresta em regeneração	esférico
<i>Mimosa</i> sp.2	trepadeira	floresta preservada	sem nódulos

Os formatos de nódulos foram registrados (Figura 2.1) e então foi decidido realizar o isolamento bacteriano a partir de cada nódulo. Para cada tipo de nódulo, em cada planta, dois nódulos foram escolhidos aleatoriamente (nódulo A e B), para o isolamento de bactérias. Um terceiro isolamento foi feito usando todos os demais nódulos daquele tipo e daquela planta (nódulos C), de forma a estimar a riqueza total de bactérias.

Figura 2.1 – Formato de nódulos (1 – esférico, 2 – bastonete, 3 – bastão, 4 – amorfo, 5 – forma de leque, 6 – aglomerado e 7 – coralóide)

Sendo assim, bactérias foram isoladas de nódulos com diferentes formatos, que foram obtidos de diferentes indivíduos e de diferentes espécies de leguminosas, resultando em um total de 212 isolados.

Riqueza fenotípica das bactérias

Uma grande riqueza fenotípica foi encontrada, sendo que diferentes leguminosas apresentaram diferentes porcentagens de fenótipos bacterianos em seus nódulos (Tabela 2.2).

A análise de agrupamento (Anexo A) foi realizada para todas as bactérias juntas, resultando em seis grupos, separados por cada planta (Tabela 2.3). Os padrões de crescimento *B. elkanii*, *R. tropici*, e *Burkholderia sp.* foram incluídos nos grupos III, V e VI, respectivamente, enquanto os três outros grupos não apresentaram características que os relacionassem aos padrões.

Tabela 2.2 – Riqueza fenotípica (%) das bactérias isoladas em cada leguminosa

Características das bactérias	Espécie de leguminosa								
	<i>G. crassifolia</i>	<i>C. speciosa</i>	<i>A. dealbata</i>	<i>M. dolens</i>	<i>M. filipetiola</i>	<i>M. furfuracea</i>	<i>M. pilulifera</i>	<i>M. scabrella</i>	<i>Mimosa sp. 1</i>
Número de isolados	23	24	24	13	19	22	10	60	17
Taxa de crescimento									
muito lento	52,2	29,2	4,2	61,5	5,3	9,1	30,0	10,0	15,8
lento	0	8,3	20,9	30,8	0	0	10,0	3,3	15,8
intermediário	26,1	8,3	58,3	7,7	26,3	50,0	40,0	15,0	10,5
rápido	8,7	45,9	8,3	0	26,3	13,6	20,0	26,7	31,6
muito rápido	13,0	8,3	8,3	0	42,1	27,3	0,0	45,0	26,3
Cor									
branco	8,7	45,8	0	0	47,4	27,3	10,0	18,3	68,4
rosa	21,7	20,8	45,8	0	0	4,5	10,0	1,7	5,3
traslucido	26,1	16,7	41,7	0	26,3	22,7	20,0	45,0	10,5
amarelo	0	0	4,2	0	5,3	0	10,0	0	0
branco com centro rosa	43,5	16,7	8,3	100	21,0	45,5	50,0	35,0	15,8
Mudança de pH									
alcanina	60,9	45,8	29,2	46,2	42,1	45,4	30,0	8,3	21,1
neutra	8,7	37,5	37,5	53,8	26,3	18,2	40,0	1,7	10,5
ácida	30,4	16,7	33,3	0	31,6	36,4	30,0	90,0	68,4
EPS									
nenhum a moderado	47,8	8,3	8,3	0	0	0	90,0	100	10,5
moderado a abundante	52,2	91,7	91,7	100	100	100	10,0	0	89,5

Tabela 2.3 – Grupo de bactérias formado para cada leguminosa

(continua)

Grupos por plantas	Bactérias isoladas *
<i>Galactia crassifolia</i>	
Grupo I	Gc11A150, Gc11A151, Gc21A135, Gc21A136, Gc21A137, Gc21B138, Gc21B139 e Gc21B140
Grupo II	Gc11C141, Gc11C142, Gc11C143 e Gc21C147
Grupo III	<i>B. elkanii</i> , Gc21C148
Grupo IV	Gc11B149, Gc21C145 e Gc21C146
Grupo V	<i>R. tropici</i> , Gc11A170, Gc11B174 e Gc11C144
Grupo VI	<i>Burkholderia sp.</i> , Gc11A169, Gc11B173, Gc11C171 e Gc11C172
<i>Collaea speciosa</i>	
Grupo I	Cs31A160, Cs31A161, Cs31B162, Cs31B163, Cs31C164, Cs41A158, Cs41A159, Cs41C154 e Cs41C155
Grupo III	<i>B. elkanii</i> , Cs12A132, Cs22A122, Cs22A123, Cs41B156 e Cs41B157
Grupo V	<i>R. tropici</i> , Cs12A131, Cs12B130, Cs12C126, Cs12C127, Cs22B124, Cs22B125, Cs22C133, Cs22C134, Cs31C217 e Cs31C218
* <i>Burkholderia sp.</i> não formou grupo com estas bactérias.	
<i>Acacia dealbata</i>	
Grupo I	Ad11C165, Ad13A244, Ad13A245, Ad13C241, Ad13C242 e Ad13C243
Grupo III	<i>B. elkanii</i> , Ad13B247, Ad21C262, Ad21C263, Ad21C264 e Ad23A271
Grupo IV	Ad21A256, Ad21A257, Ad23B254, Ad23B255 e Ad23C258
Grupo V	<i>R. tropici</i> , Ad11C166, Ad13B246, Ad21B260, Ad23A272, Ad23A273
Grupo VI	<i>Burkholderia sp.</i> , Ad13B219, Ad21B261 e Ad23C259
<i>Mimosa dolens</i>	
Grupo I	Md13A210, Md13A211, Md13B212, Md13B213, Md13C214, Md13C215, Md13C216, Md21A208, Md21A209, Md21C205, Md21C206 e Md21C207
Grupo IV	Md21C204
* <i>R. tropici</i> , <i>B. elkanii</i> e <i>Burkholderia sp.</i> não formaram grupo com estas bactérias.	
<i>Mimosa filipetiola</i>	
Grupo II	Mi17A281
Grupo III	<i>B. elkanii</i> , Mi17C091, Mi17C092, Mi17C094 e Mi23C152
Grupo IV	Mi17A279, Mi23A201, Mi23A202 e Mi23A203
Grupo V	<i>R. tropici</i> , Mi17B081, Mi17B082, Mi23A073, Mi23A074, Mi23A075, Mi23A076, Mi23B199, Mi23B200 e Mi23C153
Grupo VI	<i>Burkholderia sp.</i> , Mi17A280
<i>Mimosa furfuracea</i>	
Grupo I	Mf13A250
Grupo II	Mf13A251
Grupo III	<i>B. elkanii</i> , Mf13C252, Mf13C253, Mf24B235 e Mf24B236
Grupo IV	Mf23A265, Mf23A266, Mf23A268, Mf23B239, Mf23B240, Mf23C269 e Mf23C270
Grupo V	<i>R. tropici</i> , Mf13B093, Mf13B095, Mf13B096, Mf23A267, Mf24A238 e Mf24C234
Grupo VI	<i>Burkholderia sp.</i> , Mf24A237, Mf24C232 e Mf24C233

Tabela 2.3 – Grupo de bactérias formado para cada leguminosa

(conclusão)

Grupos por plantas		Bactérias isoladas *
<i>Mimosa pilulifera</i>		
Grupo I		Mp15A274 e Mp15A275
Grupo II		Mp26A282 e Mp26A283
Grupo IV		Mp15A276, Mp26A284, Mp26A286 e Mp26A287
Grupo V		<i>R. tropici</i> , Mp26A288
Grupo VI		<i>Burkholderia sp.</i> , Mp26A285
* <i>B. elkanii</i> não formou grupo com estas bactérias.		
<i>Mimosa scabrella</i>		
Grupo I		Ms53B226, Ms53B227, Ms63A231, Ms81A188, Ms81C077, Ms81C079 e Ms81C080
Grupo II		Ms81A189
Grupo IV		Ms63B228 e Ms63B229
Grupo V		<i>R. tropici</i> , Ms33A120, Ms33A121, Ms33C116, Ms43A085, Ms43A086, Ms43A087, Ms43B088, Ms43B089, Ms43B090, Ms53C224, Ms63C103, Ms63C104, Ms63C105, Ms63C106, Ms71B179, Ms71B180, Ms71B181, Ms71C184, Ms71C185, Ms75A182, Ms75A183, Ms75B097, Ms75B098, Ms75B099, Ms75B100, Ms75C186, Ms81C078, Ms83A177, Ms83A178, Ms83B107, Ms83B108, Ms83C175, Ms83C176, Ms85A197, Ms85A198, Ms85B196, Ms85C193 e Ms85C194
		<i>Burkholderia sp.</i> , Ms33B118, Ms33B119, Ms33C117, Ms43C222, Ms43C223, Ms53C225, Ms63A230, Ms71C187, Ms81B190, Ms81B191, Ms81B192 e Ms85B195
Grupo VI		
* <i>B. elkanii</i> não formou grupo com estas bactérias.		
<i>Mimosa sp. 1</i>		
Grupo I		M111B221, M123C112
Grupo II		M111C248
Grupo III		<i>B. elkanii</i> , M111B220, M111C249
Grupo IV		M111C278
Grupo V		<i>R. tropici</i> , M111A083, M111A084, M111A102, M111B110, M111B111, M123A101, M123C113, M123C114 e M123C115
Grupo VI		<i>Burkholderia sp.</i> , M111B109 e M111C277

* O código das bactérias isoladas corresponde às iniciais das leguminosas de que foram isoladas (Gc - *Galactia crassifolia*, Cs - *Collaea speciosa*, Ad - *Acacia dealbata*, Mf - *Mimosa furfuracea*, Mp - *Mimosa pilulifera*, Ms - *Mimosa scabrella*, Mi - *Mimosa filipetiola*, Md - *Mimosa dolens*, M1 - *Mimosa sp.1*); número do indivíduo isolado; formato do nódulo (1 – esférico, 2 – bastonete, 3 – bastão, 4 – amorfo, 5 forma de leque, 6 – aglomerado e 7 – coralóide); nódulo de isolamento (A – isolado a partir de um nódulo, B – isolado a partir de um nódulo diferente de “A”, C – obtido a partir dos demais nódulos esmagados juntos), número de estoque (três últimos algarismos).

A análise de PCA foi realizada para todo o conjunto de bactérias isoladas, no entanto o resultado foi apresentado para cada leguminosa (Figura 2.2). O eixo PCR1 provém da combinação de “crescimento” (0,59), “mudança de pH” (0,55) e “cor” (0,49), enquanto que o eixo PCR 2 é predominantemente formado por “EPS” (0,87). PCR1

explica 47,63% e PCR2 explica 24,2% da variação dos dados. Baseado na análise de agrupamento, os grupos de bactérias foram separados para cada leguminosa na PCA.

Figura 2.2 – PCA relacionando cada leguminosa (Cs - *Collaea speciosa*, Gc - *Galactia crassifolia*, Ad - *Acacia dealbata*, Md - *Mimosa dolens*, Mi - *Mimosa filipetiola*, Mf - *Mimosa furfuracea*, Mp - *Mimosa pilulifera*, Ms - *Mimosa scabrella*, M1 - *Mimosa sp.1*) com suas bactérias isoladas e grupos fenotípicos. Os padrões de crescimento foram: *Rhizobium tropici* (Rt), *Bradyrhizobium elkanii* (Be) e *Burkholderia sp.* (Bu)

Riqueza fenotípica e diversidade em cada leguminosa

A riqueza variou de dois grupos fenotípicos em *M. dolens*, até seis grupos em *G. crassifolia*, *M. furfuracea* e *Mimosa* sp. 1 (Tabelas 2.3 e 2.4). Em geral, cada leguminosa abrigou mais do que um grupo de bactéria em seus nódulos. Da mesma forma, diferentes indivíduos de uma mesma espécie vegetal geralmente apresentaram diferentes comunidades bacterianas e a maioria dos nódulos individuais foram ocupados por mais de um grupo de bactérias.

Utilizando o índice de diversidade de Shannon pôde-se observar que *G. crassifolia* apresentou maior diversidade de grupos bacterianos em seus nódulos, enquanto que *M. dolens* apresentou a menor (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Índice de diversidade de Shannon (H e J) e Grupos Fenotípicos formados (GF) para cada leguminosa

Índice	Espécies de Leguminosas								
	<i>G. crassifolia</i>	<i>C. speciosa</i>	<i>A. dealbata</i>	<i>M. dolens</i>	<i>M. filipetiola</i>	<i>M. furfuracea</i>	<i>M. pilulifera</i>	<i>M. scabrella</i>	<i>Mimosa</i> sp. 1
H	0,714	0,460	0,689	0,118	0,573	0,687	0,639	0,453	0,619
J	1	0,645	0,966	0,165	0,803	0,962	0,895	0,635	0,867
GF	6	3	5	2	5	6	5	5	6

2.2.3 Discussão

Leguminosas, nódulos e bactérias isoladas

Mattos e Mattos (1982) não encontraram nenhuma leguminosa no parque de Campos do Jordão, enquanto Robim et al. (1990) encontraram dezenove leguminosas, sendo apenas oito em sítios contendo araucárias.

De acordo com Sprent (2001), este é o primeiro relato de nodulação em *G. crassifolia*, *C. speciosa*, *M. furfuracea*, *M. pilulifera* e *M. filipetiola*.

Alguns autores utilizam a taxonomia de plantas como ferramenta para classificação dos nódulos de leguminosas (SPRENT, 2001). Para tal é necessário conhecer como ocorre o desenvolvimento do nódulo, sendo que diferentes formatos

podem estar relacionados a diferentes fases da formação desta estrutura. Em nosso estudo não foi possível estudar a fenologia dos nódulos, sendo inadequado utilizar este sistema. Apesar de ser aceita a idéia de que o formato de nódulos está relacionado à taxonomia vegetal, foi testada a hipótese que as bactérias isoladas também poderiam ter influenciado o formato de nódulos, conforme isolamento diferencial descrito acima. No entanto, não foi possível encontrar relação entre classificação fenotípica das bactérias e formato de nódulos.

Riqueza fenotípica das bactérias

Foram formados seis grupos fenotípicos, mostrando diferenças entre as bactérias amostradas. Na PCA, as variáveis que representam “crescimento” e “mudança de pH”, representadas como vetores, ficaram relacionadas próximas uma da outra. Isto podia ser esperado, já que, em geral, em rizóbios, o crescimento lento é relacionado à produção de alcalinidade, enquanto o crescimento rápido é relacionado a acidificadores (ODEE et al., 1997; SPRENT, 2001).

Como a análise de agrupamento não fornece características dos grupos formados, esta informação foi utilizada junto com a análise de PCA para caracterizar a predominância de fenótipos bacterianos em cada grupo. O grupo I pode ser caracterizado pela predominância de bactérias com crescimento lento, alcalinizadoras, brancas com o centro rosa e produção baixa a moderada de EPS. O grupo II possui características semelhantes ao grupo anterior, com exceção da taxa de crescimento intermediária e produção média a alta de EPS pelas bactérias predominantes. O grupo III possui predominância de bactérias com crescimento lento, alcalinizadoras e colônias brancas. O grupo IV possui a predominância de bactérias com crescimento intermediário, reação de pH neutra ou alcalinizante. O grupo V apresenta predominância de bactérias de crescimento rápido, acidificantes e colônias translúcidas. No grupo VI existe a predominância de bactérias com crescimento intermediário a rápido, reação ácida ou neutra e colônias brancas.

Silva e Döbereiner (1982) relataram a presença ou ausência de nódulos em leguminosas brasileiras, incluindo plantas que crescem em Florestas de Araucária.

Bactérias isoladas foram classificadas como *Rhizobium sp.*, mas a riqueza bacteriana ou diversidade não foi estudada. Sprent (2001) cita muitos trabalhos caracterizando nodulação em leguminosas brasileiras, no entanto, em geral, apenas estirpes que apresentaram interesse como inoculantes foram posteriormente caracterizadas.

Estudos similares em outros países mostraram diversidade de rizóbios obtidos a partir de várias leguminosas do Quênia, onde três grupos fenotípicos foram formados, e da Líbia, aonde cinco grupos fenotípicos foram formados (ODEE et al., 1997; MOHAMED et al., 2000). Em comparação, o presente trabalho mostra um maior número de grupos formados.

Riqueza fenotípica e diversidade em cada leguminosa

Usando plantas iscas, Melloni et al. (2006) encontraram grande diversidade de rizóbios em áreas associadas a *M. scabrella*. Naquele estudo seis grupos foram caracterizados usando *Phaseolus vulgaris* L. como planta isca e oito grupos usando *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Os índices de diversidade calculados foram, na maioria das áreas estudadas, superiores aos encontrados no presente trabalho.

Em geral, trabalhos de diversidade fenotípica de rizóbios relacionam riqueza e diversidade em relação à área de estudo, e não relativa às plantas estudadas (ODEE et al., 1997; MOHAMED et al., 2000). Entretanto, estes dados podem ser interessantes como forma de comparar a especificidade ou a promiscuidade das leguminosas, podendo trazer informações valiosas para outros estudos de diversidade, como por exemplo, embasamento para a escolha de plantas iscas.

2.3 Conclusões

Foram identificadas onze leguminosas no Parque Estadual de Campos do Jordão, sendo que nove delas estavam noduladas. Cinco leguminosas foram relatadas como nodulantes pela primeira vez.

Uma grande diversidade fenotípica de formato de nódulos e bactérias isoladas foi encontrada. Várias das bactérias isoladas diferem fenotipicamente dos padrões de crescimento utilizados.

Houve variabilidade nos índices de diversidade calculados, sendo que *G. crassifolia* apresentou o maior índice de diversidade de bactérias dentro de seus nódulos, sendo considerada a mais promíscua, enquanto que *M. dolens* apresentou o menor índice, sendo considerada a mais específica.

Referências

- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, e *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, Feb. 2006.
- BRASIL. Portaria nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, 23 jan. 1992. p.870-872.
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to le reclamation e sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v.29, n. 5/6, p.897-903, May 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 1992. 92p. (Série Manuais Técnicos em Geociências, 1).
- LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 269p.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179p.
- MATTOS, J.R.; MATTOS, N.F. Contribuição ao conhecimento da flora do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.16, n.1, p.647-662, 1982.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.235-246, Mar./Abr. 2006.

MOHAMED, S.H.; SMOUNI, A.; NEYRA, M.; KHARCHAF, D.; FILALI-MALTOUF, A. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 224, p.171-83, Sep. 2000.

ODEE, D.W.; SUTHERLE, J.M.; MAKATIANI, E.T.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I. Phenotypic characteristics e composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, n. 1, p.65-75, Jan. 1997.

ROBIM, M.J.; PASTORE, J.A.; AGUIAR, O.T.; BAITELLO, J.B. Flora arbóreo arbustiva e herbácea do Parque Estadual de Campos do Jordão (SP). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 31-53, 1990.

RODERJAN, C.V.; KUNYOSHI, Y.S.; GALVÃO, F. As regiões fitogeográficas do Paraná. **Acta Forestalia Brasiliensis**, São Paulo, v.1, p.1-5, 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS: User's guide: statistics**. Cary: Institute Inc. 6th ed. 2002.

SEIBERT, P.; NEGREIROS, O.C.; BUENO, R.A.; EMMERICH, W.; MOURA NETTO, B.V.; MARCONDES, M.A.P.; CESAR, S.F.; GUILLAUMON, J.R.; MONTAGNA, R.A.A.; BARRETO, N.J.C.B.; GARRIDO, M.A.O.; MELLO FILHO, L.E.; EMMERICH, M.; MATTOS, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; GODOI, A. **Plano de manejo do Parque Estadual Campos de Jordão**. São Paulo: Instituto Florestal, 1975. 148p. (Boletim Técnico do Instituto Florestal, 19).

SILVA, E.M.R.; DÖBEREINER, J. O papel das leguminosas no reflorestamento. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 7., Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade econômica dos reflorestamentos. 1982. Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1982. p.33-52.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146 p.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IPB. Handbook, 15).

3 DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS EM FLORESTA DE ARAUCÁRIA

Resumo

O uso do seqüenciamento do gene 16S rRNA é uma ferramenta de grande utilidade na taxonomia de bactérias. Através dessa técnica, em bactérias nodulantes, descobriu-se que não apenas α -proteobactérias, mas também β -proteobactérias, são capazes de formar nódulos em leguminosas, surgindo os termos α -rizóbios e β -rizóbios. Um dos fatores limitantes à confirmação se uma bactéria é um rizóbio é a disponibilidade de sementes da planta original da qual a bactéria foi isolada para testar-se o postulado de Koch. Neste caso, podem ser usadas sementes de outras plantas, mas sem garantia de sucesso. Testes de eficiência simbiótica são essenciais para o uso de rizóbios em sistemas agrícolas ou florestais. Os objetivos deste trabalho foram testar a eficiência simbiótica de bactérias isoladas de leguminosas que crescem em meio a Floresta de Araucária, utilizando bracatinga e feijoeiro como plantas testes, fazer o seqüenciamento do gene 16S rRNA para fornecer resolução taxonômica aos isolados, e testar a diversidade genética das bactérias em relação às plantas das quais foram isoladas. Dos 212 isolados, 55 cepas foram capazes de nodular o feijoeiro (25.9%) e 56 estirpes de nodular a bracatinga (26.4%). Nenhuma estirpe apresentou alta eficiência simbiótica, no entanto, foram obtidos altos coeficientes de variação nos experimentos, o que pode ter prejudicado as comparações. Foi seqüenciado parcialmente o gene 16S rRNA de 196 estirpes (92,4% dos isolados), as quais foram classificadas como pertencentes a oito grupos genotípicos, *Pantoea* sp. (3 isolados, 2%), *Pseudomonas* sp. (4 isolados, 2%), *Bradyrhizobium* sp1 (20 isolados, 10%), *Bradyrhizobium* sp2 (14 isolados, 7%), *Rhizobium* sp. (2 isolados, 1%), *Burkholderia* sp1 (28 isolados, 14%), *Burkholderia* sp2 (51 isolados, 26%) e *Burkholderia* sp3 (74 isolados, 38%). Através de análise filogenética mostrou-se que a maioria dos grupos pertence a gêneros taxonomicamente relacionados a rizóbios, sendo os β -rizóbios predominantes no presente estudo. Houve variação na diversidade das bactérias em relação às plantas das quais foram isoladas. *G. crassifolia* apresentou o maior valor, sendo considerada a mais promíscua, enquanto que *A. dealbata* e *M. dolens* apresentaram os menores valores, sendo consideradas as mais específicas. Mostrou-se, neste trabalho, que o uso de avaliação fenotípica de rizóbios pode ser inadequado, já que os resultados fenotípicos foram na maioria das vezes divergentes dos genotípicos, sendo os últimos considerados de maior precisão.

Palavras chave: Fixação biológica de nitrogênio; α -rizóbios; β -rizóbios; 16S rRNA; Taxonomia; Filogenia

GENETIC DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFECTIVENESS OF RHIZOBIA ISOLATED IN AN ARAUCARIA FOREST

Abstract

The 16S rRNA gene sequencing is a very useful tool in bacterial taxonomy. Using this technique for nodulating bacteria, it was found that members of Betaproteobacteria may nodulate leguminous plants, instead of the previous notion that only Alphaproteobacteria can do so, originating the terms α -rhizobia and β -rhizobia. One of the restraints to confirm if bacteria are rhizobia is the availability of seeds of the plant from which bacteria were first isolated to test Koch's postulate. In this case seeds of other legumes may be used, but without insurance of success. Symbiotic effectiveness tests are essential for the use of rhizobia in agricultural or forest systems. The objectives of this work were to test the symbiotic effectiveness of bacteria isolated from legumes of an Araucaria Forest, using bracinga (*Mimosa scabrella*) and common beans as test plants, to use the 16S rRNA sequencing to provide taxonomic resolution of the isolated bacteria, and to test the genetic diversity of bacteria according to the plants they were isolated from. Of 212 isolated bacteria, 55 strains were able to nodulate beans (25.9%) and 56 strains were able to nodulate bracinga (26.4%). None of the strains showed high symbiotic effectiveness, but a high variation coefficient was found in the experiments, making comparisons uncertain. A total of 196 strains (92.4% of the isolated bacteria) were sequenced which were identified as pertaining to eight genotypic groups: *Pantoea* sp. (3 isolates, 2%), *Pseudomonas* sp. (4 isolates, 2%), *Bradyrhizobium* sp1 (20 isolates, 10%), *Bradyrhizobium* sp2 (14 isolates, 7%), *Rhizobium* sp. (2 isolates, 1%), *Burkholderia* sp1 (28 isolates, 14%), *Burkholderia* sp2 (51 isolates, 26%) and *Burkholderia* sp3 (74 isolates, 38%). According to the phylogenetic analyses, most of the groups belong to genera taxonomically related to rhizobia, with β -rhizobia predominant in the present study. There was variability in the bacterial diversity related to the isolated plants, where *G. crassifolia* showed the highest value, being considered the most promiscuous, while *A. dealbata* and *M. dolens* presented the lowest values, and were considered the most specific ones. The present study showed that phenotypic analysis of rhizobia may be inadequate, since the phenotypic and the genotypic analysis of the strains was mostly divergent, and the latter is considered more precise.

Keywords: Biological nitrogen fixation; α -rhizobia, β -rhizobia; 16S rRNA; Taxonomy; Phylogeny

3.1 Introdução

A partir da filogenia baseada no gene 16S rRNA, a taxonomia de bactérias vem passando por várias modificações (COHAN, 2002), sendo que alguns pesquisadores defendem o uso desta técnica para resolução taxonômica de bactérias (COLE, 2005).

A partir do isolamento de rizóbios, e utilizando o seqüenciamento do gene 16S rRNA para a identificação das bactérias, Moulin et al. (2001) demonstraram que espécies de *Burkholderia* podem formar nódulos em duas espécies de leguminosas estudadas. Trabalhos posteriores mostraram que outras leguminosas das Américas formam nódulos com este gênero, estudando rizóbios associados com *Mimosa scabrella* (CHEN et al., 2005; ELLIOTT et al., 2007), espécie presente no Parque Estadual de Campos do Jordão.

Acreditava-se que apenas bactérias da subclasse Alfaproteobacteria eram aptas a formar nódulos em leguminosas (SPRENT, 2001). Com estas descobertas concluiu-se que bactérias do subgrupo Betaproteobacteria também são, surgindo os termos α -rizóbios e β -rizóbios, para diferenciar bactérias das duas subclasses.

As pesquisas que envolvem rizóbios trabalham com o isolamento de bactérias a partir de nódulos, seguido da inoculação e de re-isolamento desta bactéria, de acordo com o postulado de Koch. Com este procedimento muitas bactérias que estão presentes nos nódulos, mas não completam o postulado de Koch são descartadas, muitas vezes impossibilitando a descoberta de novas espécies ou o estudo da função que estes organismos teriam no nódulo. Muitas vezes um dos fatores limitantes para estes estudos de re-inoculação é a indisponibilidade de sementes da planta da qual as bactérias foram isoladas, podendo, neste caso, serem utilizadas sementes de outras espécies do mesmo gênero, ou outras plantas taxonomicamente próximas (MOULIN, 2001; SPRENT, 2001), mas sem garantia de sucesso.

M. scabrella foi a única planta encontrada no Parque Estadual de Campos do Jordão, que possui importância florestal e, conseqüentemente, disponibilidade de sementes. Entre as leguminosas conhecidas, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das plantas que apresenta maior promiscuidade (SPRENT, 2001) e, ao mesmo tempo,

apresenta grande importância para nosso país, sendo de relevância seu uso em estudos de nodulação.

Ao mesmo tempo em que estas plantas podem servir para o estudo das bactérias quanto ao postulado de Koch, o estudo desta interação quanto à eficiência simbiótica é um teste básico para a seleção de estirpes eficientes que possam ser usadas com fins agrônômicos ou florestais (FARIA; FRANCO, 2002). Bracatinga e feijoeiro podem ser cultivados em consórcio com araucárias e estirpes de rizóbios de alta eficiência simbiótica poderão ser utilizadas para inocular aquelas leguminosas, colaborando com aporte de nitrogênio ao sistema. Esta técnica pode trazer conseqüente economia de fertilizante e aumento de produtividade, favorecendo assim o cultivo da araucária.

Os objetivos deste trabalho foram testar quais dos isolados obtidos a partir de leguminosas de Floresta de Araucária (Capítulo 2) são capazes de formar nódulos em bracatinga e feijoeiro, testando a eficiência simbiótica, utilizar o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA para fornecer resolução taxonômica das bactérias isoladas, e testar a diversidade genética das bactérias em relação as plantas das quais foram isoladas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Bactérias utilizadas

Foram utilizadas as bactérias isoladas conforme descrito no Capítulo 2. As bactérias foram mantidas em meio YMA (VINCENT, 1970) quando em uso ou armazenadas em YM : glicerol 50% (1:1) a -20 °C (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Ensaio de Nodulação

As sementes de *M. scabrella* e *P. vulgaris* foram desinfestadas superficialmente através da imersão em etanol 96% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos, seguida de 4 lavagens em água esterilizada (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). Posteriormente à desinfestação, as sementes de *M. scabrella* tiveram

a sua dormência quebrada através da imersão em água esterilizada a 80 °C, deixando-as em repouso até o dia seguinte (CARNEIRO et al., 1982).

As sementes foram semeadas em potes de plástico com capacidade para 400 ml, esterilizados com etanol 70%, contendo areia:vermiculita (2:1), esterilizada por autoclavagem (120 °C por 2 horas). Estes vasos foram irrigados semanalmente com solução esterilizada (120 °C por 20 minutos) de Hoagland, com omissão de nitrogênio, modificada por Sarruge, ou com água esterilizada, conforme a necessidade (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Todas as estirpes bacterianas isoladas no Capítulo 2 foram cultivadas em 5 ml de meio YM (VINCENT, 1970) a 28 °C sob agitação até saturação visual do meio (3-7 dias conforme a estirpe), sendo estas armazenadas a 4 °C até o momento da inoculação.

Os vasos com as plantas recém-germinadas foram separados pela espécie de leguminosa em bancadas e distribuídos ao acaso. Cada vaso foi inoculado com 1 ml do inoculante preparado, sendo três repetições para cada estirpe, em um delineamento inteiramente casualizado. Como controle negativo de nodulação foram utilizados trinta vasos sem inoculação para a bracinga e trinta para o feijoeiro, sendo utilizados para as análises estatísticas apenas três vasos escolhidos aleatoriamente. Para avaliar o crescimento das plantas sem limitação de N foram utilizados três vasos para cada espécie vegetal, sem inoculação, fertilizadas com 100 mg de N na forma de nitrato de amônio.

Logo, foram constituídos dois experimentos, um com feijoeiro e outro com bracinga, possuindo 214 tratamentos, sendo, 212 estirpes, 1 controle sem inoculação e com omissão de nitrogênio e 1 controle sem inoculação e com adubação de nitrogênio, com três repetições, sendo cada vaso considerado uma parcela, em um delineamento inteiramente casualizado.

O feijoeiro foi colhido aos quarenta dias e a bracinga aos sessenta dias, avaliando-se presença ou ausência de nódulos e matéria seca da parte aérea.

A eficiência simbiótica foi avaliada através da comparação de produção de matéria seca das plantas em relação ao controle negativo e ao tratamento adubado com N (FARIA; FRANCO, 2002).

Diversidade genética

Extração do DNA

Partes das colônias obtidas, cultivadas em meio YMA, foram transferidas com um palito de madeira para cada poço de microplacas plásticas (96 poços) contendo 100 µl de H₂O. A placa foi então selada com adesivo estéril e homogeneizada até formar uma suspensão de células. A lise destas células foi realizada levando a placa para um termociclador, elevando-se a temperatura para 100 °C por 5 minutos (adaptado de ODEE et al., 2002).

A placa foi então colocada em um isopor com gelo para utilização desta suspensão de DNA (e restos celulares) em PCR ou estocada a -20 °C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores de reação (*primers*) Y1 e Y3 (ODEE et al., 2002), desenvolvidos para amplificação parcial do gene 16S rRNA de rizóbios. A reação foi composta de 5 µl da suspensão de DNA, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 125 nM de cada *primer* e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, sendo o volume completado com água ultra-pura autoclavada para 50 µl. A reação foi conduzida em um termociclador com as seguintes condições: desnaturação inicial a 93 °C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação (93 °C por 45 segundos), anelamento (62 °C por 45 segundos) e extensão (72 °C por 2 minutos); e uma extensão final a 72 °C por 2 minutos (ODEE et al., 2002).

Purificação dos produtos de PCR

O DNA amplificado foi purificado com acetato de amônio (CROUSE; AMORESE, 1987), através da adição aos produtos de PCR de 30 µl de acetato de amônio 7,5 M e 100 µl de etanol absoluto, seguido de homogeneização e centrifugação por 45 minutos, 2250 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com a adição

150 µl etanol 70% e centrifugação por 15 minutos, 2250 x g, a 4 °C, seguido do descarte do sobrenadante. O precipitado foi seco por 1 hora a 37 °C e ressuspendido em 15 µl de H₂O (adaptado de PISA, 2006).

Quantificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) contendo brometo de etídeo 0,5 µg / mL, utilizando-se 3 µl das amostras (ALVES, 2005). Como padrões de comparação foram utilizados *1kb DNA ladder (Invitrogen)* e pGEM, para a quantificação do tamanho e da concentração das bandas formadas, respectivamente. O gel foi submetido à corrida de 8 V por cm por 1 hora. O DNA amplificado foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e registrado por uma câmera digital acoplada.

A quantificação de tamanho e concentração de DNA foi feita por comparação visual dos padrões.

Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA obtido pela amplificação por PCR, 2 µl de ET Terminator (*GE Health Care* - “*General Electrics Health Care*”), 2 µl de Tampão “Save Money” (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂.6H₂O), 5 pmol do *primer* Y1 e água ultra-pura autoclavada para completar o volume de 10 µl (ALVES, 2005). A reação foi conduzida em termociclador, com 30 ciclos de: desnaturação (95 °C por 20 segundos), anelamento (55 °C por 15 segundos), e extensão (60 °C por 1 minuto). O produto foi então purificado com acetato de sódio, seguindo instruções do fabricante (*GE Health Care*).

Após purificação o precipitado foi re-suspendido em 10 µl de formamida e submetido ao seqüenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

*Análise das seqüências*¹

O cromatograma obtido pelo seqüenciador foi processado pelo aplicativo Phred (EWING; GREEN, 1998), utilizando-se o comando “trim” para eliminar as extremidades de baixa qualidade das seqüências e gerar os arquivos *.fasta* (contendo as seqüências processadas) e *.qual* (contendo informações sobre a qualidade das seqüências).

Para a separação dos grupos genotípicos, estas seqüências foram alinhadas entre si, utilizando o programa ClustalW, tomando-se o cuidado de eliminar as extremidades não alinhadas, devido aos diferentes tamanhos de comprimento das seqüências. Utilizando-se este alinhamento, foi construída uma árvore de similaridade das seqüências, utilizando o programa Mega 3.1 (método UPGMA, p-distance). A partir desta árvore foram formados os grupos genotípicos, agrupando-se as bactérias que possuíam seqüências com 95% de similaridade, ou mais, em grupos distintos.

É aceito que bactérias com seqüências do gene 16S rRNA que possuem menos de 97% de similaridade podem ser consideradas espécies diferentes (GEVERS et al., 2005). No presente trabalho, devido à utilização de seqüências únicas de 530 pb (o que pode gerar dúvida quanto à sua qualidade), optou-se por um padrão de separação mais conservador, de 95%, admitindo uma possibilidade de erro de 2%. Este padrão pode permitir que bactérias de espécies diferentes sejam agrupadas em um mesmo grupo, porém, não permite que espécies iguais sejam agrupadas em grupos distintos.

A partir dos grupos formados foi selecionada uma seqüência de cada grupo, usando como critério maior tamanho e qualidade (seqüências visualizadas individualmente através dos arquivos *.fasta* e *.qual* gerados pelo aplicativo Phred). As bactérias das quais foram obtidas estas seqüências foram consideradas como estirpes tipo de cada grupo genotípico e estas seqüências foram utilizadas para as próximas análises.

As seqüências destas estirpes tipo foram submetidas à identificação com o programa CLASSIFIER, disponível no *síte* do RDPII (2007), sendo identificadas a nível

¹ As seqüências obtidas serão depositadas no *GenBank*. Qualquer dúvida, pode-se contatar o autor <drlammel@gmail.com>.

de gênero. Todas as estirpes pertencentes a cada grupo genotípico receberam a mesma identificação da estirpe tipo de seu grupo.

A filogenia foi realizada utilizando seqüências do gene 16S rRNA das estirpes tipo de cada grupo genotípico em conjunto com seqüências de espécies de bactérias pertencentes aos gêneros identificados (Anexo B). As seqüências destas espécies foram obtidas no *síte* do RDPII (2007) e no GenBank (2007).

A construção das árvores filogenéticas foi realizada a partir do alinhamento destas seqüências pelo programa ClustalW e processamento pelo programa Mega 3.1 (PISA, 2006). Foram utilizados os métodos “*Neighbor-Joining*”, “*Minimum Evolution*” e “*Maximum Parsimony*”, com configurações padrões do programa, e 1000 amostras *bootstrap*, sendo utilizadas as árvores consenso de *bootstraps*.

Análise estatística

Os valores de matéria seca das plantas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas, utilizando o teste de Tukey (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002). Quando ocorreram diferenças significativas foi calculada a eficiência (Matéria seca da planta inoculada / Controle sem inoculação e com omissão de nitrogênio), e eficácia (Matéria seca da planta inoculada / Controle sem inoculação e adubado com nitrogênio) das bactérias (FARIA; FRANCO, 2002).

Utilizando a classificação de grupos genotípicos foram calculados os índices de diversidade de Shannon, H, e equivalência de Shannon, J (MAGURRAN, 1988), por espécie de planta, de forma a estimar a promiscuidade comparativa das leguminosas.

3.2.2 Resultados

Ensaio de nodulação

Houve contaminação parcial dos controles negativos de nodulação, sendo onze potes contaminados para o feijoeiro (36%) e três para a bracinga (10%). Desta forma, consideramos nodulação positiva apenas quando as três repetições do feijoeiro que

havia sido inoculadas fossem positivas quanto à nodulação e, para a bracinga quando ocorressem duas ou três repetições noduladas (Anexo C). Utilizando este critério 55 estirpes foram capazes de nodular o feijoeiro (25.9%) e 56 estirpes de nodular a bracinga (26.4%).

Ocorreu diferença na produção de matéria seca das plantas apenas em relação àquelas adubadas com nitrogênio, não havendo diferenças entre plantas não inoculadas e não fertilizadas e aquelas inoculadas com bactérias (Anexos D e E).

Classificação genotípica

A partir da análise de similaridade das seqüências obtidas foram delimitados oito grupos genotípicos, sendo escolhidas as estirpes tipo para cada grupo (Tabela 3.1). O grupo 1 apresentou baixa homologia com gêneros de bactérias conhecidas (88% com *Pantoea*), no entanto, como não foi possível um maior detalhamento deste grupo, adotou-se, provisoriamente, este gênero.

Tabela 3.1 – Grupos genotípicos formados (GG), estirpes tipo selecionadas, identificação via RDPII, seguida do limite de confiança e taxonomia adotada para cada grupo genotípico

GG	Estirpe Tipo	Identificação RDPII	Taxonomia Adotada
1	Mp26A285	<i>Pantoea</i> ; 88%	<i>Pantoea</i> sp.
2	Ad21B261	<i>Bradyrhizobium</i> ; 100%	<i>Bradyrhizobium</i> sp1
3	Mf13C253	<i>Bradyrhizobium</i> ; 100%	<i>Bradyrhizobium</i> sp2
4	Cs31C217	<i>Rhizobium</i> ; 99%	<i>Rhizobium</i> sp.
5	Mf24A238	<i>Pseudomonas</i> ; 100%	<i>Pseudomonas</i> sp.
6	Cs12B130	<i>Burkholderia</i> ; 100%	<i>Burkholderia</i> sp1
7	Gc21C145	<i>Burkholderia</i> ; 100%	<i>Burkholderia</i> sp2
8	Ms33C116	<i>Burkholderia</i> ; 100%	<i>Burkholderia</i> sp3

As estirpes foram então classificadas quanto à nodulação em feijoeiro e bracinga, pelos grupos genotípicos, identificadas de acordo com a taxonomia adotada na Tabela 3.1 e comparadas aos grupos fenotípicos do Capítulo 2 (Anexo C). Não houve relação entre grupos genotípicos e fenotípicos, havendo na maioria das vezes vários grupos fenotípicos para um mesmo grupo genotípico.

Foi observado um predomínio de bactérias classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (78%), seguido do gênero *Bradyrhizobium* (17%), entre todos os isolados seqüenciados (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Frequência de cada grupo genotípico (cada fatia representa o grupo genotípico, número de isolados e % em relação ao total)

Separando as bactérias isoladas por suas plantas de origem e pelos grupos genotípicos formados, observa-se, em geral, uma tendência semelhante entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie de leguminosa (Tabela 3.2). A exceção foi a planta *C. speciosa*, que apresentou comportamento diferenciado entre os indivíduos (Tabela 3.3). Analisando estes indivíduos, observou-se que eles também apresentaram formatos distintos de nódulos, já que todas as bactérias foram identificadas de acordo com o formato do nódulo de que foram isoladas (Capítulo 2). Entre todas as espécies analisadas esta foi a única planta que apresentou este comportamento, sugerindo que as espécies de bactérias podem estar relacionadas ao formato de nódulos.

Quanto à ocorrência de diferentes grupos genotípicos dentro de um mesmo nódulo, não houve um padrão entre as plantas e isolados. Em alguns casos ocorreu no nódulo a presença de um único grupo genotípico e em outros casos não (Tabela 3.3). Em vários casos ocorreu a presença de um único grupo genotípico dentro de um nódulo, mas com diferentes grupos fenotípicos. Também ocorreram casos de grupos genotípicos diferentes, no entanto com menos grupos fenotípicos.

Tabela 3.2 – Ocorrência das bactérias isoladas em suas plantas de origem (ind. é o indivíduo coletado) e respectivos grupos genotípicos (continua)

Plantas	Número de isolados								nd *	Total
	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp1	<i>Bradyrhizobium</i> sp2	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp1	<i>Burkholderia</i> sp2	<i>Burkholderia</i> sp3		
<i>A. dealbata</i>										
ind1		7							3	10
ind2		11							3	14
Total	0	18	0	0	0	0	0	0	6	24
<i>C. speciosa</i>										
ind1						5				5
ind2						5		1		6
ind3			4	2					1	7
ind4			3						3	6
Total	0	0	7	2	0	10	0	1	4	24
<i>G. crassifolia</i>										
ind 1		1	3				1	6	2	13
ind 2		1	3				6			10
Total	0	2	6	0	0	0	7	6	2	23
<i>M. dolens</i>										
ind 1							7			7
ind 2							6			6
Total	0	0	0	0	0	0	13	0	0	13
<i>M. furfuracea</i>										
ind 1	1		1					3	2	7
ind 2					2		10	3		15
Total	1	0	1	0	2	0	10	6	2	22
<i>M. filipetiola</i>										
ind 1	1						6	1		8
ind 2						7	3	1		11
Total	1	0	0	0	0	7	9	2	0	19

Tabela 3.2 – Ocorrência das bactérias isoladas em suas plantas de origem (ind. é o indivíduo coletado) e respectivos grupos genotípicos (conclusão)

Plantas	Número de aislados								nd *	Total
	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp1	<i>Bradyrhizobium</i> sp2	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp1	<i>Burkholderia</i> sp2	<i>Burkholderia</i> sp3		
<i>M. pilulifera</i>										
ind 1							3			3
ind 2	1						6			7
<i>Total</i>	1	0	0	0	0	0	9	0	0	10
<i>M. scabrella</i>										
ind 1					2			4		6
ind 2								7	1	8
ind 3						1	1	2		4
ind 4								8		8
ind 5								12	1	13
ind 6						5		16		21
<i>Total</i>	0	0	0	0	2	6	1	49	2	60
<i>Mimosa sp. 1</i>										
ind1						1	1	6		8
ind2						1		4		5
ind3						3	1			4
<i>Total</i>	0	0	0	0	0	5	2	10	0	17
Total **	3	20	14	2	4	28	51	74	16	212

* nd – não disponível, corresponde às bactérias que apresentaram problemas no seqüenciamento / identificação.

** Total de bactérias isoladas de todas as plantas coletadas.

Tabela 3.3 – Características genótípicas (8 grupos genotípicos denominados de 1 a 8) e fenotípicas (6 grupos genotípicos denominados 1 a 6) dos isolados, de acordo com a planta, tipo de nódulo e isolamento realizado (A – um nódulo único; B – um nódulo único diferente de A; e C – isolamento a partir de vários outros nódulos esmagados em conjunto – vide Capítulo 2)
(continua)

Legume	Formato do nódulo	Isolado A			Isolado B			Isolado C		
		Código	GG	GF	Código	GG	GF	Código	GG	GF
<i>C. speciosa</i>										
ind. 1	bastonete	Cs12A131	6	5	Cs12B128	nd*	nd	Cs12C126	6	5
		Cs12A132	6	3	Cs12B129	nd	nd	Cs12C127	6	5
					Cs12B130	6	5			
ind. 2	bastonete	Cs22A122	8	3	Cs22B124	6	5	Cs22C133	6	5
		Cs22A123	6	3	Cs22B125	6	5	Cs22C134	6	5
ind. 3	esférico	Cs31A160	nd	1	Cs31B162	3	1	Cs31C164	3	1
		Cs31A161	3	1	Cs31B163	3	1	Cs31C217	4	5
								Cs31C218	4	5
ind. 4	esférico	Cs41A158	3	1	Cs41B156	nd	3	Cs41C154	nd	1
		Cs41A159	nd	1	Cs41B157	3	3	Cs41C155	3	1
<i>G. crassifolia</i>										
ind. 1	esférico	Gc11A150	8	1	Gc11B149	7	4	Gc11C141	3	2
		Gc11A151	2	1	Gc11B173	nd	6	Gc11C142	3	2
		Gc11A169	8	6	Gc11B174	8	5	Gc11C143	3	2
		Gc11A170	8	5				Gc11C144	8	5
								Gc11C171	8	6
								Gc11C172	nd	6
indiv. 2	esférico	Gc21A135	7	1	Gc21B138	2	1	Gc21C145	7	1
		Gc21A136	7	1	Gc21B139	7	1	Gc21C146	7	4
		Gc21A137	7	1	Gc21B140	3	1	Gc21C147	3	4
								Gc21C148	3	2
<i>A. dealbata</i>										
ind. 1	esférico	nd			Ad11B167	2		Ad11C165	nd	1
					Ad11B168	2		Ad11C166	2	5
ind. 1	bastão	Ad13A244	2	1	Ad13B219	nd	6	Ad13C241	2	1
		Ad13A245	nd	1	Ad13B246	nd	5	Ad13C242	2	1
					Ad13B247	nd	3	Ad13C243	2	1
ind. 2	esférico	Ad21A256	2	4	Ad21B260	2	5	Ad21C262	2	3
		Ad21A257	2	4	Ad21B261	2	6	Ad21C263	2	3
								Ad21C264		3
ind. 2	bastão	Ad23A271	2	3	Ad23B254	2	4	Ad23C258	2	4
		Ad23A272	nd	5	Ad23B255	2	4	Ad23C259	2	6
<i>M. dolens</i>										
ind. 1	bastão	Md13A210	7	1	Md13B212	7	1	Md13C214	7	1
		Md13A211	7	1	Md13B213	7	1	Md13C215	7	1
								Md13C216	7	1

Tabela 3.3 – Características genótípicas (8 grupos genotípicos denominados de 1 a 8) e fenotípicas (6 grupos genotípicos denominados 1 a 6) dos isolados, de acordo com a planta, tipo de nódulo e isolamento realizado (A – um nódulo único; B – um nódulo único diferente de A; e C – isolamento a partir de vários outros nódulos esmagados em conjunto – vide Capítulo 2) (continuação)

(continuação)

Legume	Formato do nódulo	Isolado A			Isolado B			Isolado C					
		Código	GG	GF	Código	GG	GF	Código	GG	GF			
ind. 2	esférico	Md21A208	7	1	nd			Md21C204	7	4			
		Md21A209	7	1				Md21C205	7	1			
								Md21C206	7	1			
								Md21C207	7	1			
<i>M. filipetiola</i>													
ind. 1	coralóide	Mi17A279	7	4	Mi17B081	7	5	Mi17C091	7	3			
		Mi17A280	1	6				Mi17B082	8	5	Mi17C092	7	3
		Mi17A281	7	2							Mi17C094	7	3
ind. 2	bastão	Mi23A073	6	5	Mi23B199	8	5	Mi23C152	6	3			
		Mi23A074	6	5							Mi23B200	6	5
		Mi23A075	6	5									
		Mi23A076	6	5									
		Mi23A201	7	4									
		Mi23A202	7	4									
		Mi23A203	7	4									
<i>M. furfuracea</i>													
ind. 1	bastão	Mf13A250	1	1	Mf13B093	8	5	Mf13C252	nd	3			
		Mf13A251	nd	2				Mf13B095	8	5	Mf13C253	3	3
					Mf13B096	8	5						
ind. 2	bastão	Mf23A265	7	4	Mf23B239	7	4	Mf23C269	7	4			
		Mf23A266	7	4							Mf23B240	7	4
		Mf23A267	7	5									
		Mf23A268	7	4									
ind. 2	amorfo	Mf24A237	5	6	Mf24B235	7	3	Mf24C232	8	6			
		Mf24A238	5	5							Mf24B236	7	3
							Mf24C234	8	5				
<i>M. pilulifera</i>													
ind. 1	forma de leque	Mp15A274	7	1	nd			nd					
		Mp15A275	7	1									
		Mp15A276	7	4									
ind. 2	aglomerado	Mp26A282	7	2	nd			nd					
		Mp26A283	7	2									
		Mp26A284	7	4									
		Mp26A286	7	4									
		Mp26A287	7	4									
		Mp26A288	7	5									
		Mp26A285	1	6									
<i>M. scabrella</i>													
ind. 3	bastão	Ms33A120	5	5	Ms33B118	8	6	Ms33C116	8	5			
		Ms33A121	5	5							Ms33B119	8	6

Tabela 3.3 – Características genótípicas (8 grupos genotípicos denominados de 1 a 8) e fenotípicas (6 grupos genotípicos denominados 1 a 6) dos isolados, de acordo com a planta, tipo de nódulo e isolamento realizado (A – um nódulo único; B – um nódulo único diferente de A; e C – isolamento a partir de vários outros nódulos esmagados em conjunto – vide Capítulo 2) (conclusão)

Legume	Formato do nódulo	Isolado A			Isolado B			Isolado C		
		Código	GG	GF	Código	GG	GF	Código	GG	GF
ind. 4	bastão	Ms43A085	8	5	Ms43B088	nd	5	Ms43C222	8	6
		Ms43A086	8	5	Ms43B089	8	5	Ms43C223	8	6
		Ms43A087	8	5	Ms43B090	8	5			
ind. 5	bastão	nd			Ms53B226	7	1	Ms53C224	8	5
					Ms53B227	6	1	Ms53C225	8	6
ind. 6	bastão	Ms63A230	8	6	Ms63B228	8	4	Ms63C103	8	5
		Ms63A231	8	1	Ms63B229	8	4	Ms63C104	8	5
								Ms63C105	8	5
								Ms63C106	8	5
ind. 7	esférico	nd			Ms71B179	8	5	Ms71C184	8	5
					Ms71B180	8	5	Ms71C185	8	5
					Ms71B181	8	5			
ind. 7	forma de leque	Ms75A182	8	5	Ms75B097	8	5	Ms75C186	8	5
		Ms75A183	8	5	Ms75B098	8	5	Ms75C187	nd	6
					Ms75B099	8	5			
					Ms75B100	8	5			
ind. 8	esférico	Ms81A188	6	1	Ms81B190	8	6	Ms81C077	6	1
		Ms81A189	6	2	Ms81B191	8	6	Ms81C078	8	5
					Ms81B192	8	6	Ms81C079	6	1
								Ms81C080	6	1
ind. 8	bastão	Ms83A177	8	5	Ms83B107	8	5	Ms83C175	8	5
		Ms83A178	8	5	Ms83B108	8	5	Ms83C176	8	5
ind. 8	forma de leque	Ms85A197	8	5	Ms85B195	8	6	Ms85C193	8	5
		Ms85A198	8	5	Ms85B196	8	5	Ms85C194	8	5
Mimosa sp.1										
ind. 1	esférico	M111A083	8	5	M111B109	8	6	M111C277	6	6
		M111A084	8	5	M111B110	8	5	M111C278	7	4
					M111B111	8	5			
ind. 2	bastão	M123A101	8	5	nd			M123C112	6	1
		M123A102	8	5				M123C113	8	5
								M123C114	8	5
								M123C115	8	5
ind.3	esférico	nd			M131B220	6	3	M131C248	6	2
					M131B221	7	1	M131C249	6	3

* nd = não disponível (estirpe morta ou sem seqüência).

Filogenia baseada no gene 16S rRNA

As seqüências de DNA do gene 16S rRNA das estirpes tipo de cada grupo genotípico foram alinhadas com seqüências de estirpes tipo de espécies pertencentes aos gêneros identificados na Tabela 3.1, sendo construídas as árvores filogenéticas para “*Neighbor-joining*” (Figura 3.2), “*Minimum Evolution*” (Figura 3.3) e “*Maximum Parsimony*” (Figura 3.4).

Figura 3.2 – Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Neighbor-joining*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 3.3 – Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Minimum evolution*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 3.4 – Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Maximum parsimony*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Diversidade de rizóbios entre as leguminosas

A partir dos grupos genotípicos formados, foi calculado o índice de diversidade de Shannon, como forma de comparar a promiscuidade de cada planta analisada (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Índice de diversidade de Shannon (H e J), Grupos Genotípicos Formados (GG) para cada leguminosa. “Gen” para dados genotípicos e “Fen” para os fenotípicos (obtidos no Capítulo 2); GF Grupos Fenotípicos formados (Capítulo 2)

Índice	Espécies de Leguminosas								
	<i>G. crassifolia</i>	<i>C. speciosa</i>	<i>A. dealbata</i>	<i>M. dolens</i>	<i>M. filipetiola</i>	<i>M. furfuracea</i>	<i>M. pilulifera</i>	<i>M. scabrella</i>	<i>Mimosa sp. 1</i>
Gen									
H	0,5792	0,4838	0,0002	0,0003	0,4992	0,4681	0,1415	0,2639	0,4215
J	1	0,8352	0,0004	0,0005	0,8618	0,8082	0,2443	0,4556	0,7277
GG	4	4	1	1	4	4	2	4	3
Fen									
H	0,714	0,460	0,689	0,118	0,573	0,687	0,639	0,453	0,619
J	1	0,645	0,966	0,165	0,803	0,962	0,895	0,635	0,867
GF	6	3	5	2	5	6	5	5	6

3.2.2 Discussão

Ensaio de nodulação

A utilização de substrato sem suplementação de nitrogênio pode ter sido uma condição muito severa para o desenvolvimento das plantas, o que pode ter prejudicado a sua nodulação. A semente de bracatinga é uma semente pequena, com pouca reserva de nitrogênio, e a omissão deste nutriente parece ter prejudicado o desenvolvimento das plantas, já que o controle adubado teve um crescimento muito superior aos demais tratamentos. A formação de nódulos e fixação de nitrogênio é um processo de alto custo energético para a planta, sendo necessário um correto suprimento de nutrientes para que ocorra (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, o tempo de avaliação, 40-60 dias após a germinação, pode ter sido curto demais para aparecerem os efeitos da nodulação e fixação. Estes fatores em conjunto podem ter sido a causa, para a bracatinga, de não terem ocorrido diferenças na massa de matéria seca entre as plantas inoculadas e a testemunha com omissão de N, já que as plantas, com exceção das fertilizadas com nitrogênio, estavam em severas condições de estresse nutricional, fatos observados visualmente, tendo as folhas coloração amarelada e perda de folhas, sintomas típicos de deficiência de nitrogênio (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Mesmo que houvesse ocorrido diferenças, não era esperado um crescimento similar ao controle adubado. Apesar da bracatinga fixar uma grande quantidade de nitrogênio, podendo colaborar anualmente com uma quantidade entre 180-200 kg de N por hectare na serrapilheira (BERLALOT et al. 2004; CARVALHO, 2007), ela é uma espécie de baixa eficácia (38-40%) quanto à fixação de nitrogênio (FARIA; FRANCO, 2002). Sendo assim, até hoje não foram descritas estirpes capazes de um suprimento adequado de N para que a bracatinga obtenha o mesmo rendimento que uma planta adubada. Para o feijoeiro também foi descrita a problemática de baixa eficiência e eficácia, não sabendo se o problema está relacionado às cultivares de feijoeiro ou às estirpes utilizadas (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Os dados de matéria seca, tanto do feijoeiro, como da bracatinga, apresentaram altos coeficientes de variação, 40.5% e 30.8%, respectivamente, o que pode ter

ocultado diferenças significativas entre os tratamentos nos dois experimentos. Provavelmente as principais causas desta variação foi a contaminação de alguns vasos testemunha com bactérias nodulantes, o que também pode ter acontecido nas parcelas que foram inoculadas, e a utilização de apenas três repetições, com apenas uma planta por vaso, número que pode ter sido baixo para garantir confiabilidade na obtenção dos dados para análise. No caso da bracatinga, já que as sementes florestais são coletadas a partir de diversas árvores, o alto coeficiente de variação pode estar relacionado com a variabilidade genética entre as sementes. Nos dois experimentos, a germinação das sementes não foi homogênea entre as parcelas e, apesar do experimento ser ao acaso, este fato pode ter colaborado com os altos coeficientes de variação. Não foi possível, com este experimento, a avaliação do potencial simbiótico das estirpes isoladas.

Por outro lado, o ensaio cumpriu seu objetivo de avaliação geral das estirpes quanto à nodulação. A partir destes dados de nodulação, juntamente com os de grupos genotípicos formados, pode ser realizado um experimento de menor porte, caracterizando um número menor de estirpes, no entanto com maior detalhamento. Estes ensaios poderiam usar a marcação das bactérias com genes repórteres, microscopia detalhada e ensaio com redução de acetileno (CHEN et al., 2003; ELLIOTT et al., 2007), tendo assim, uma caracterização mais precisa da simbiose realizada pelos rizóbios isolados.

Também seria interessante a aquisição de sementes das espécies nativas, das quais cada bactéria foi isolada, como forma de caracterizar todos os isolados quanto à nodulação, já que a maioria das bactérias foram testadas, quanto ao postulado de Koch, em plantas diferentes das quais foram inicialmente isoladas.

Classificação genotípica

Foram formados oito grupos genotípicos, sendo encontrado tanto α -rizóbios quanto β -rizóbios, concordando com trabalhos recentes (CHEN et al., 2003; BARRETT; PARKER, 2006). Odee et al. (2002) encontrou apenas α -rizóbios em seu trabalho, enquanto que os outros autores também trabalharam com β -rizóbios. Chen et al. (2003) e Barrett e Parker (2006) caracterizaram a presença de β -rizóbios em leguminosas tropicais, enquanto nesse estudo em discussão obteve-se a presença de β -rizóbios em

leguminosas sub-tropicais. Este fato pode ser indício de que a posição geográfica e evolução fitogeográfica da vegetação e co-evolução das estirpes de rizóbio são fatores mais importantes para a presença de β -rizóbios do que a temperatura da região onde se encontram. Todas as leguminosas coletadas apresentaram *Burkholderia spp.* em seus nódulos, com exceção de *A. dealbata*, que, embora colhida na área de estudo, não é planta nativa do local. Este fato reforça a hipótese acima.

Algumas das bactérias isoladas não estão relacionadas a grupos taxonômicos descritos como rizóbios, como o caso da *Pantoea sp.* Apesar disso, mesmo estas foram mantidas num esforço de caracterizar todas as bactérias presentes no nódulo, independentemente de formarem nódulo ou não, tendo-se um panorama geral de diversidade dentro do nódulo das leguminosas estudadas. Por outro lado este esforço foi restrito, já que a própria técnica de isolamento favorece a seleção de rizóbios (VINCENT, 1970) e é conhecido que muitas espécies de bactérias não podem ser cultivadas (COHAN, 2002). A confirmação de que estas espécies diferentes dos rizóbios “convencionais” de fato causam nodulação de plantas será complicada, pois a obtenção de sementes das leguminosas das quais foram isoladas é difícil. Haveria entretanto a possibilidade de estudos de inoculação destas bactérias em plantas promíscuas, do seqüenciamento do gene *nifH*, que codifica para a enzima nitrogenase, e, ou, de genes relacionados a simbiose, como o gene *nodA* (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2003; ELLIOTT et al., 2006).

Filogenia baseada no gene 16S rRNA

Três modelos matemáticos distintos apontaram árvores filogenéticas muito semelhantes, com apenas algumas pequenas mudanças em relação ao consenso de *bootstraps*, fato que incrementa a confiabilidade nessas árvores. Ocorreu apenas uma ramificação distinta do gênero *Bradyrhizobium* e do grupo externo “*Actinomyces oricola*” no qual houve um agrupamento divergente utilizando “*Maximum Parsimony*”, quando comparado aos outros dois modelos. Entretanto, foram utilizadas seqüências de apenas 530 pb, o que pode ter levado a algumas incertezas em certas regiões da árvore, gerando valores de *bootstraps* inferior a 50.

Comparando-se as seqüências obtidas com outras de bactérias já anteriormente caracterizadas, pode-se observar que muitas formaram grupos com bactérias já descritas como rizóbios. *Burkholderia* sp2 formou grupo com isolados de Barrett e Parker (2006), *Burkholderia* sp3 com uma estirpe estudada por Chen et al. (2005; 2006), *Burkholderia mimosarum* Br3454, estirpe que é recomendada pela EMBRAPA para a bracinga (FARIA; FRANCO, 2002), e os demais isolados com gêneros que possuem espécies nodulantes (CHEN et al., 2003, SPRENT, 2001), com exceção de *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp. que estão relacionadas a bactérias endofíticas de plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), mas não nodulantes.

A baixa similaridade de *Pantoea* sp., quando classificada pelo site RDP-II, somada à maior distância encontrada nas árvores filogenéticas são indícios de que se trata de uma nova espécie ou de um novo gênero. No entanto, a taxonomia de bactérias é uma ciência complexa e para a confirmação de novas espécies ou gêneros se faz necessário o seqüenciamento completo do gene 16S rRNA e a hibridização DNA:DNA com espécies próximas, entre outros ensaios (COHAN, 2002; GEVERS et al., 2005; CHEN et al., 2006).

Da mesma forma, com o uso da classificação pelo site RDP-II, atinge-se apenas a classificação em gêneros dos isolados, sendo necessário o completo seqüenciamento do gene 16S rRNA das bactérias para uma adequada identificação e filogenia, podendo então ser encontrados candidatos a espécies novas.

Diversidade de rizóbios entre as leguminosas

A ocupação dos nódulos pelos grupos genotípicos mostrou-se variável, podendo haver mais de um grupo dentro de um mesmo nódulo e diferentes padrões de ocupação, de acordo com indivíduo e planta coletada.

Com o auxílio do índice de diversidade de Shannon verificou-se que as leguminosas *G. crassifolia*, *M. filipetiola* e *C. speciosa* foram as mais promíscuas quanto à presença de bactérias em seus nódulos. Este dado é muito interessante para a escolha de plantas iscas, que poderiam colaborar para estudos ambientais de diversidade de rizóbios em áreas semelhantes.

C. speciosa foi a única planta a apresentar um padrão diferencial de comunidade bacteriana em relação ao formato do nódulo. Observou-se ver que nódulos ocupados por *Burkholderia* spp. apresentaram formato bastonete, enquanto que nódulos ocupados por *Bradyrhizobium* spp. apresentaram formato esférico. Esta observação contraria a teoria que o formato de nódulos é dependente exclusivamente da planta (SPRENT, 2001), merecendo uma melhor investigação.

Comparando-se a avaliação genotípica e fenotípica, em geral foi encontrado um número maior de grupos para cada espécie de leguminosa através da avaliação fenotípica; somente em *C. speciosa* foram encontrados mais grupos genotípicos do que fenotípicos. Esta observação mostra a fragilidade do uso de características fenotípicas para a discriminação de grupos, já que grupos diferentes no fenótipo acabaram sendo agrupados no mesmo genótipo. Além disso, em alguns casos, os mesmos grupos fenotípicos estavam relacionados a diferentes grupos genotípicos, como o caso de *Burkholderia* spp. que poderia ser confundida com *Rhizobium* sp., caso não tivesse sido feita a análise genotípica.

A análise genotípica foi mais restritiva quanto à formação de grupos por plantas, no entanto não quanto ao número total de grupos formados (6 fenótipos X 8 genótipos) o que reflete a postura conservadora de análise neste estudo (utilização de 95% de similaridade entre seqüências). A discriminação de grupos poderia ser ainda melhorada com o seqüenciamento de uma região maior do gene 16S rRNA, com a utilização de *primers* internos para garantir maior confiabilidade das seqüências ou, ainda, utilizar abordagens multilocos (GEVERS et al., 2005) o que seria financeiramente inviável nesse estudo.

3.3 Conclusões

Foi verificado que das 212 estirpes isoladas (Capítulo 2), 55 são capazes de nodular o feijoeiro e 56 a bracatinga. Não foi possível avaliar a eficiência simbiótica destas estirpes.

Os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* (2 grupos distintos), *Rhizobium*, *Burkholderia* (3 grupos distintos) e a

um quinto gênero, similar a *Pantoea* (88%), formando, no total, oito grupos genotípicos distintos.

Os grupos genotípicos formados estão relacionados a espécies de rizóbios e bactérias endofíticas conhecidas. São necessários novos estudos para caracterizar detalhadamente a função dos isolados nos nódulos de leguminosas.

Houve variabilidade nos índices de diversidade calculados, onde *G. crassifolia* apresentou o maior valor, sendo considerada a mais promíscua, enquanto que *A. dealbata* e *M. dolens* apresentaram os menores valores, sendo consideradas as mais específicas.

Observaram-se divergências comparando-se as avaliações fenotípica e genotípica. Utilizando-se a classificação fenotípica, com exceção de *C. speciosa*, foram obtidos maiores valores de índice de diversidade, no entanto foi formado um menor número de grupos em relação à classificação genotípica.

Grupos genotípicos taxonomicamente distintos, como os gêneros *Burkholderia* e *Rhizobium*, poderiam ter sido considerados iguais em uma avaliação exclusivamente fenotípica, mostrando a fragilidade deste método.

Referências

ALVES, H. S. **Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)**. 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

BERTALOT, M. J. A.; GUERRINI, I. A.; MENDOZA, E.; DUBOC, E.; BARREIROS, R. M.; CORRÊA, F. M. Retorno de nutrientes ao solo via deposição de serrapilheira de quatro espécies leguminosas arbóreas na região de Botucatu - São Paulo, Brasil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, p. 219-227, 2004.

CARVALHO, P. E. R. **ESPÉCIES FLORESTAIS BRASILEIRAS**: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm>. Acesso em: 23 fev. 2007.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. National Center for Biotechnology Information.

GENBANK: NIH genetic sequence database. Disponível em
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>>. Acesso em: 23 fev. 2007.

CARNEIRO, R. M.; ALMEIDA JUNIOR, A. R. de; KAGEYAMA, P. Y.; DIAS, I. S.
Importância da dormência das sementes na regeneração da bracatinga - *Mimosa scabrella* Benth. Piracicaba: IPEF, 1982. 10 p. (IPEF. Circular técnica, 149).

COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p 457-487, Oct. 2002.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, D. M; McGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 294-296, Jan. 2005.

CHEN, W. M.; MOULIN, L; BONTEMPS, C; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVNI-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, Dec. 2003.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO J. L.; CHOU, J.H.; CHOU. Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT. G. N.; SPRENT J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES E. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied e Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, Nov. 2005.

CHEN, W. M. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1847-1851, Aug. 2006.

CROUSE J, AMORESE D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. **Focus**, Rockville, v. 19, n. 1, p. 13-16, 1997.

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies arbóreas.** Seropédica: EMBRAPA, 2002. 16 p. (EMBRAPA. Documento, 158).

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; PEER, Y. Van de; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 733-739, Sep. 2005.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia do Solo**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. O. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

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

ODEE, D. W.; HAUKKA, K.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M.; YOUNG J. P. W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 34, n. 6, p. 801-811, Jun. 2002.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística experimental aplicada a experimentos agronômicos e florestais**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

PISA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) Capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. Center for microbiology ecology. **RDPII**: Ribosomal database project. Disponível em < <http://rdp.cme.msu.edu> >. Acesso em: 23 fev. 2007.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Biodiversidade do rizóbio que nodula feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose**. Seropédica: EMBRAPA, 1999. 51 p. (EMBRAPA. Documento, 94).

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146 p.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodulate bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IPB. Handbook, 15).

4 DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS EM FLORESTAS DE ARAUCÁRIA COM DIFERENTES NÍVEIS DE INTERFERÊNCIA ANTRÓPICA

Resumo

Floresta de Araucária é o nome dado a florestas que possuem a dominância de *Araucaria angustifolia*. Esta espécie foi devastada pela atividade antrópica e agora se encontra ameaçada de extinção. O nitrogênio é um nutriente essencial à vida, sendo que bactérias denominadas rizóbios podem apresentar grande importância no aporte deste nutriente aos sistemas florestais. Os objetivos deste trabalho foram isolar rizóbios em Florestas de Araucária com diferentes níveis de interferência antrópica, sendo, Floresta Nativa, Floresta Plantada e Floresta em Regeneração; avaliar a diversidade dos isolados; e utilizar estes dados como indicadores de qualidade do solo. Para a captura de rizóbios foram utilizadas as plantas iscas caupi (*Vigna unguiculata*), amendoim (*Arachis hypogaea*), soja (*Glycine max*), bracatinga (*Mimosa scabrella*), maricá (*Mimosa bimucronata*) e angico (*Parapiptadenia rigida*), crescidas em casa de vegetação, utilizando amostras de solo das áreas como substrato. Bactérias foram isoladas dos nódulos formados, utilizando o meio de cultura YMA. Estas bactérias foram classificadas genotipicamente a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA e a diversidade calculada pelo índice de Shannon. A planta-isca maricá foi a mais eficiente na captura de rizóbios, sendo discutível a utilização de plantas-isca que não são adaptadas ao solo amostrado, neste caso o uso de plantas de interesse agrônomo em amostras de solos florestais ácidos com baixos níveis de nutrientes. Bracatinga e caupi apresentaram menor eficiência que o maricá, sendo que as demais plantas falharam na captura de rizóbios. Foram isoladas setenta e oito cepas, sendo classificadas como pertencentes a seis grupos genotípicos, *Pseudomonas* sp. (2 isolados, 3%), *Xanthomonas* sp. (2 isolados, 1%), *Ralstonia* sp. (5 isolados, 6%), *Herbaspirillum* sp. (3 isolados, 4%), *Burkholderia* sp1 (23 isolados, 29%) e *Burkholderia* sp3 (44 isolados, 57%). Através de análise filogenética constatou-se que a maioria dos grupos está relacionada a rizóbios ou bactérias endofíticas conhecidas. A Floresta em Regeneração apresentou uma maior diversidade de bactérias isoladas, enquanto que as Florestas Plantada e Nativa apresentaram índices semelhantes. O uso de índices de diversidade de rizóbios como indicadores de qualidade do solo precisa ser aprimorado, padronizando-se as técnicas de isolamento dos rizóbios e estabelecendo-se padrões de qualidade de solo. Não havendo estes padrões, o uso desta técnica não foi possível no presente trabalho.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; Qualidade do solo; 16S rRNA, Taxonomia, Filogenia

Rhizobia diversity in araucaria forests with different levels of anthropogenic interference

Abstract

Araucaria Forest is the name of forests which have the dominance of *Araucaria angustifolia*. This plant was devastated by anthropogenic activity and is now an endangered species. Nitrogen is an essential nutrient for life, and bacteria denominated rhizobia may play an important role in the input of this nutrient in forest systems. The aims of this study were to isolate rhizobia in Araucaria Forests with different levels of anthropogenic interference (Preserved Forest, Planted Forest and Recovering Forest); to test the diversity of isolated bacteria; to use this data as soil quality indices. Cowpea (*Vigna unguiculata*), peanut (*Arachis hypogaea*), soybean (*Glycine max*), bracatinga (*Mimosa scabrella*), maricá (*Mimosa bimucronata*), and angico (*Parapiptadenia rigida*), were used as trap-plants to capture rhizobia, growing in the greenhouse, using soil samples from those areas as substrate. Bacteria were isolated from plant nodules using YMA culture medium. The isolated bacteria were genotypically classified using 16S rRNA sequencing and diversity was calculated using the Shannon index. Maricá was the most efficient trap-plant to capture rhizobia, casting doubt on the use of plants not adapted to the sampled soil, in this case the use of agricultural plants in samples of acid forest soil with low level of nutrients. Bracatinga and caupi showed a lower efficiency and the other plants failed to capture rhizobia. A total of 78 bacterial strains were isolated and were classified in six genotypic groups: *Pseudomonas* sp. (2 strains, 3%), *Xanthomonas* sp. (2 strains, 1%), *Ralstonia* sp. (5 strains, 6%), *Herbaspirillum* sp. (3 strains, 4%), *Burkholderia* sp1 (23 strains, 29%) and *Burkholderia* sp3 (44 strains, 57%). Phylogenetic analysis showed that most of these groups are related to known rhizobia or other endophytic bacteria. The Recovering Forest showed the highest diversity of isolated bacteria, while Planted Forests and Preserved Forest showed similar indices. The use of rhizobia diversity as soil quality index needs to be evaluated, it is important that techniques for rhizobia isolation be standardized and that soil quality standards be established. Without this standardization, the use of this technique was not possible in this study.

Key-words: Biological Nitrogen Fixation; Soil quality; 16S rRNA; Taxonomy; Phylogeny

4.1 Introdução

Floresta de Araucária é o nome dado a florestas que possuem dominância do pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro ou araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktz.), podendo ser dividida em floresta plantada ou nativa. Florestas de Araucária nativas são um sub-tipo de Mata Atlântica, chamado de Floresta Ombrófila Mista.

Devido à exploração predatória e expansão da fronteira agrícola a araucária se encontra ameaçada de extinção (SANQUETA; TETTO, 1999). Estudos envolvendo a sustentabilidade das florestas plantadas, em regeneração e nativas de araucária são de grande importância para garantir a sobrevivência desta espécie, já que podem trazer informações que favoreçam seu manejo.

O nitrogênio é um nutriente essencial para a vida, sendo que em ecossistemas naturais sua presença está relacionada especialmente aos organismos fixadores de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entre estes organismos destacam-se os rizóbios, que fixam nitrogênio em simbiose com leguminosas (SPRENT, 2001). Devido a esta importância, os rizóbios, assim como outras bactérias, podem ser usados como bioindicadores da qualidade do solo, no entanto, não havendo ainda parâmetros definidos para este uso (KASCHUCK et al., 2005; ZILLI et al., 2003).

Dentre as leguminosas da Floresta Ombrófila Mista destaca-se a bracatinga (*Mimosa scabrella*), planta de crescimento rápido, com grande potencial para uso em reflorestamentos de uso econômico e alto potencial de fixação de nitrogênio (BERLALOT, 2004; CARVALHO, 2007). O plantio desta leguminosa em consórcio com araucária pode favorecer o desenvolvimento desta espécie, através do aumento de nitrogênio no sistema.

Os objetivos deste trabalho foram isolar rizóbios de Florestas de Araucária, através do uso de leguminosas iscas; testar a diversidade dos isolados; e utilizar estes dados como indicadores da qualidade do solo. Testaram-se áreas com diferentes níveis de interferência antrópica, sendo Floresta Nativa, Floresta Plantada e Floresta em Regeneração.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Coleta do solo

As coletas de solo foram realizadas em março e julho de 2006, no Parque Estadual de Campos do Jordão (Apêndice B), no município de Campos do Jordão, SP, coordenadas geográficas 22°40'S e 45°26'W. O clima local é do tipo Cfb (classificação de Köppen), caracterizado como clima subtropical de altitude, mesotérmico e úmido, precipitação pluvial média anual de 1804 mm e temperaturas médias variando de 17,5 °C, no mês mais quente (fevereiro) a 11,5 °C, no mês mais frio (junho), podendo chegar a temperaturas negativas (SEIBERT et al., 1974).

Em cada área de estudo (Floresta Nativa, Floresta Plantada e Floresta em Regeneração) foram escolhidos aleatoriamente cinco pontos, retirando-se amostras de 400 g de solo na profundidade de 0-20 cm, formando-se assim uma amostra composta por sistema estudado. Foi tomado o cuidado de flambar o equipamento de coleta, pá de jardinagem e trado, para evitar contaminação entre as amostras de diferentes áreas. As amostras de terra foram transportadas em isopor com gelo até Piracicaba, onde parte foi utilizada para análise química e o restante como substrato para as plantas iscas.

Caracterização das Áreas

A Mata Nativa é uma Floresta Ombrófila Mista, possuindo coordenadas geográficas 22° 41' 29" S e 45° 27' 52" W.

A Floresta Plantada é constituída por um plantio misto de araucária e podocarpo. Foi plantada em 1959 e desde então pouco manejada. O sub-bosque é pobre em outras espécies, estando o solo coberto por acículas das árvores. Coordenadas geográficas 22° 39' 31" S e 45° 26' 34" W.

A Floresta em Regeneração é uma área onde foram plantadas araucárias em 1959, no entanto com uma densidade baixa que permite o crescimento de muitas

plantas no sub-bosque. A área sofreu queima em 2001, por fogo acidental, e desde então tem um intenso crescimento de plantas provenientes do banco de sementes do solo. Coordenadas geográficas 22° 39' 49" S e 45° 26' 58" W.

As três áreas utilizadas neste estudo estão sujeitas, em maior ou menor grau, ao tráfego de animais exóticos, entre eles eqüinos, bovinos, aves e pessoas (turistas, moradores e funcionários do parque).

Segundo interpretação do Boletim 100 (IAC, 1996), o solo (Tabela 4.1) dessas áreas tem pH muito baixo e baixos níveis de nutrientes, especialmente Ca e Mg.

Tabela 4.1 – Características químicas do solo nas três áreas de estudo

Floresta	pH CaCl ₂	MO ⁺ g dm ⁻³	P (resina) mg dm ⁻³	K ⁺ -----	Ca ⁺² mmolc ³ dm ⁻³	Mg ⁺² -----	H+Al ⁺³ -----
Nativa	3,6	79	19	1,8	2	2	185
Plantada	3,7	90	10	1,4	1	1	176
Regeneração	3,9	100	17	1,6	2	2	166

* MO = Matéria orgânica

Isolamento de rizóbios do solo através de plantas iscas

Foram utilizadas como plantas iscas as espécies de leguminosas que podem ser encontradas em sub-bosque de araucária, *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Parapiptadenia rigida* (angico) (CARVALHO, 2007), além de *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze (maricá), espécie nativa encontrada no estado de São Paulo. Estas espécies apresentam importância tanto para o reflorestamento para fins econômicos como para recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2007). Também foram utilizadas as plantas *Vigna unguiculata* (caupi), *Arachis hypogaea* L. (amendoim), plantas que apresentam importância agrônômica e são descritas como promíscuas (BOGINO et al, 2006; MELLONI et al. 2006), além de *Glycine max* (soja).

As plantas (sementes desinfestadas como descrito no Capítulo 3) foram cultivadas em vasos de Leonard esterilizados (VINCENT, 1970), utilizando-se 400 gramas de solo por vaso e solução nutritiva de Hoagland com omissão de nitrogênio, com 4 repetições para as espécies florestais e 3 para as demais, em cada amostra de

solo, com duas plantas por vaso para as florestais e uma para as demais (VINCENT, 1970; MELLONI et al., 2006). Para a testemunha foi utilizado substrato esterilizado, uma mistura de areia e vermiculita (2:1) autoclavada (1 atm, 120 °C por 2 horas) (pH CaCl_2 5,8), com e sem adubação nitrogenada (100 mg de N na forma de nitrato de amônio por vaso), para as florestais. Para as demais espécies empregou-se como testemunha solo das áreas de estudo após autoclavagem (1 atm, 120 °C por 2 horas), com e sem inoculação para a soja e o caupi (usando *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* para a soja e estas duas espécies em conjunto com *Rhizobium tropici* para o caupi). O experimento com as plantas de interesse agrônômico foi instalado em março de 2006 e com as espécies florestais em junho de 2006, ambos em casa de vegetação.

As plantas foram colhidas com 90 dias para as espécies florestais e 50 dias para as demais, contados a partir da germinação, e as seguintes variáveis foram avaliadas: quantidade de nódulos, massa da matéria fresca dos nódulos (a matéria seca dos nódulos não foi determinada, pois estes foram utilizados para o isolamento das bactérias), massa da matéria seca das raízes e massa da matéria seca da parte aérea.

Os nódulos obtidos foram destacados e, então, realizado o isolamento de rizóbios em meio YMA, conforme descrito por Vincent (1970).

Diversidade genética dos isolados

Foi utilizada a metodologia descrita no Capítulo 3.

Análise estatística

A matéria seca das plantas, número e massa fresca de nódulos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando ocorreu significância, ao teste de Tukey para comparação de médias (PIMENTEL; GOMES, 2002). Estas análises foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS, 2002).

Foi feita uma análise de componentes principais, utilizando a população de rizóbios de cada área (LEPS; SMILAUER, 2002).

Foram calculadas as diversidades de rizóbios para as espécies de plantas iscas e para as diferentes áreas amostradas, utilizando-se o índice de Shannon (MELLONI et al. 2006).

4.2.2 Resultados

Planta iscas

As plantas iscas *Parapiptadenia rigida* (angico), *Glycine max* (soja) e *Arachis hypogaea* (amendoim) não formaram nódulos com rizóbios das amostras de solo coletadas. Já as plantas iscas *Mimosa scabrella* (bracatinga), e *Mimosa bimucronata* (maricá) formaram nódulos em todas as amostras de solo utilizadas, enquanto que *Vigna unguiculata* (caupi) produziu nódulos apenas quando crescendo em solo da Floresta em Regeneração. Houve nodulação dos controles positivos de caupi e soja e os controles negativos, sem inoculação, não apresentaram nódulos.

Houve variação na produção de matéria seca das plantas e nodulação apenas em relação aos controles (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

Tabela 4.2 – Produção de matéria seca e nódulos utilizando a planta isca caupi (médias de 3 repetições, e comparações utilizando teste de Tukey a 5%)

Substrato originário de	Parte Aérea (g)	Raiz (g)	MS Total (g)	Nódulos*	
				Número	Massa (g)
Mata Nativa	0,163 a	0,121 a	0,284 a	0 b	0 b
Reflorestamento	0,503 a	0,315 a	0,818 a	0 b	0 b
Mata em regeneração	0,502 a	0,283 a	0,786 a	2 b	0,021 b
Areia estéril (inoculada)	0,406 a	0,266 a	0,672 a	44 a	0,533 a
Solo esterilizado (inoculado)	0,264 a	0,204 a	0,468 a	11 b	0,069 b
Solo esterilizado	0,218 a	0,121 a	0,339 a	0 b	0 b
Coeficiente de Variação:	67,2%	70,5%	67,3%	52,3%	13,2%

* Na análise estatística os valores de número e massa de nódulos foram transformados por $(\sqrt{x} + 1)$.

Tabela 4.3 – Produção de matéria seca e nódulos utilizando a planta isca bracatinga (médias de 4 repetições, e comparações utilizando teste de Tukey a 5%)

Substrato originário de	Parte Aérea (g)	Raiz (g)	MS Total (g)	Nódulos *	
				Número	Massa (g)
Mata Nativa	0,6437 b	0,3007 b	0,9444 b	49 a	0,2898 a
Reflorestamento	0,6625 b	0,3867 a b	1,0492 b	85 a	0,3697 a
Mata em regeneração	0,4870 b	0,2174 b	0,7044 b	107 a	0,4093 a
Substrato estéril c/ N	1,8358 a	0,9856 a	2,8214 a	0 b	0 b
Substrato estéril s/N	0,1366 b	0,1424 b	0,2790 b	0 b	0 b
Coeficiente de Variação:	63,3%	69,1%	63,3%	33,7%	8,3%

* Na análise estatística os valores de número e massa de nódulos foram transformados por $(\sqrt{x} + 1)$.

Tabela 4.4 – Produção de matéria seca e nódulos utilizando a planta isca maricá (médias de 4 repetições, e comparações utilizando teste de Tukey a 5%)

Substrato originário de	Parte Aérea (g)	Raiz (g)	MS Total (g)	Nódulos *	
				Número	Massa (g)
Mata Nativa	0,914 b	0,508 b	1,422 b	44 a	0,306 a
Reflorestamento	0,895 b	0,496 b	1,392 b c	28 a	0,093 b
Mata em regeneração	0,628 b	0,331 b c	0,959 b c	50 a	0,119 a b
Substrato estéril c/ N	5,371 a	1,635 a	7,007 a	0 b	0 c
Substrato estéril s/N	0,204 b	0,189 c	0,393 c	0 b	0 c
Coeficiente de Variação:	24,2%	19,3%	20,6%	38,5%	9,5%

* Na análise estatística os valores de número e massa de nódulos foram transformados por $(\sqrt{x} + 1)$.

Diversidade e filogenia das bactérias isoladas

Foram isoladas trinta e quatro cepas a partir da planta isca maricá, trinta e quatro bactérias a partir da bracatinga e dez a partir do caupi, totalizando setenta e oito isolados.

Todas as bactérias isoladas tiveram o gene 16S rRNA parcialmente seqüenciado e, a partir da análise de similaridade das seqüências obtidas (fragmento de 530 bases), foram delimitados seis grupos genotípicos, sendo escolhidas as estirpes tipo para cada grupo, identificadas via RDP II (Tabela 4.5). Alinhando-se estas estirpes tipo às obtidas no Capítulo 3, observou-se que os grupos genotípicos *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp2 e *Burkholderia* sp3 são os mesmos (similaridade maior que 95%).

Tabela 4.5 – Grupos genotípicos formados, estirpes tipo para cada grupo, identificação destas estirpes via RDPII, seguido do limite de confiança e a taxonomia adotada para cada grupo

Grupo	Estirpe ¹	Identificação RDP II	Taxonomia adotada
1	Vu41RE	<i>Pseudomonas</i> ; 100%	<i>Pseudomonas</i> sp. ²
2	Mb340RE	<i>Xanthomonas</i> ; 97%	<i>Xanthomonas</i> sp.
3	Vu62RE	<i>Ralstonia</i> ; 100%	<i>Ralstonia</i> sp.
4	Mb349PL	<i>Herbaspirillum</i> ; 100%	<i>Herbaspirillum</i> sp.
5	Vu59RE	<i>Burkholderia</i> ; 100%	<i>Burkholderia</i> sp2 ²
6	Mb334RE	<i>Burkholderia</i> ; 100%	<i>Burkholderia</i> sp3 ²

¹ O código corresponde a: Planta isca utilizada (duas primeiras letras – Vu, *Vigna unguiculata* e Mb, *Mimosa bimucronata*), seguido do número de estocagem e área em que foi isolada (RE – Floresta em Regeneração, PL – Floresta Plantada e PR – Floresta Preservada).

² Isolados pertencentes aos mesmos grupos constituídos no Capítulo 3, adotando-se a mesma taxonomia.

Todas as estirpes foram então classificadas quanto a estes grupos genotípicos formados (anexo F) e suas ocorrências identificadas de acordo com a área de coleta e planta-isca utilizada (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Ocorrência de cada grupo genotípico, de acordo com a área (PR = Floresta Preservada, PL = Floresta Plantada e RE = Floresta em Regeneração), e cada planta isca utilizada (Vu - caupi, Ms - bracatinga e Mb - maricá)

GG	PR			PL			RE			Total
	Vu	Ms	Mb	Vu	Ms	Mb	Vu	Ms	Mb	
1 <i>Pseudomonas</i> sp.						1		1		2
2 <i>Xanthomonas</i> sp.									1	1
3 <i>Ralstonia</i> sp.								5		5
4 <i>Herbaspirillum</i> sp.						2			1	3
5 <i>Burkholderia</i> sp2		2	11		13	6	4	6	2	44
6 <i>Burkholderia</i> sp3		8	4		3	1		1	6	23
Total	0	10	15	0	17	9	10	7	10	78

O gênero *Burkholderia* (86 %) foi predominante entre os isolados, sendo a *Burkholderia* sp2 de maior frequência (Figura 4.1). Estes dados são semelhantes aos encontrados no Capítulo 3, com exceção que entre aqueles isolados houve predomínio de *Burkholderia* sp3.

Figura 4.1 – Frequência de cada grupo genotípico (cada fatia representa o grupo genotípico, número de isolados e % em relação ao total)

Foi calculado o índice de diversidade de Shannon para cada leguminosa, como forma de comparar a especificidade ou promiscuidade de cada planta (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Índice de diversidade de Shannon (H e J) e número de Grupos Genotípicos Formados (GG), para cada leguminosa

Índice	<i>M. bimucronata</i>	<i>M. scabrella</i>	<i>V. unguiculata</i>
H	0,438	0,334	0,410
J	1	0,763	0,936
GG	4	3	3

As seqüências de DNA do gene 16S rRNA das estirpes escolhidas como tipo, para cada grupo genotípico deste trabalho, foram alinhadas com seqüências de estirpes tipo de espécies pertencentes aos gêneros identificados na Tabela 4.4, sendo construídas as árvores filogenéticas “*Neighbor-joining*” (Figura 4.2), “*Minimum Evolution*” (Figura 4.3) e “*Maximum Parsimony*” (Figura 4.4).

Figura 4.2 – Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Neighbor-joining*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 4.3 – Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Minimum evolution*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Figura 4.4 – Árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rRNA de estirpes tipo (seguida do grupo genotípico, GG, e taxonomia adotada, ou número de acesso no GenBank), construída pelo método de “*Maximum parsimony*”, árvore consenso de *bootstraps*, utilizando 1000 replicações

Diversidade de rizóbios nas áreas em estudo

A partir dos grupos genotípicos formados para cada área, foi calculado o índice de diversidade de Shannon, como forma de comparar a diversidade de rizóbios nas áreas (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Índice de diversidade de Shannon (H e J) e número de Grupos Genotípicos Formados (GG), para cada área amostrada

Índice	Áreas		
	<i>Floresta Preservada</i>	<i>Floresta Plantada</i>	<i>Floresta em Regeneração</i>
H	0,309	0,362	0,603
J	0,513	0,599	1
GG	2	4	6

Discriminação das áreas por PCA

Com a frequência de grupos genotípicos formados foi realizada a análise de componentes principais (Figura 4.4). O eixo PCR1 explica 56.1% da variabilidade dos dados enquanto que o eixo PCR2 43.9%.

Figura 4.4 – PCA entre a frequência de grupos genotípicos e as áreas de estudo (PR – Floresta Preservada, PL – Floresta Plantada e RE – Floresta em Regeneração)

4.2.3 Discussão

Plantas iscas

A acidez do solo pode ter sido limitante para o desenvolvimento das culturas não florestais (soja, caupi e amendoim), já que está relacionado à presença de alumínio e toxicidade às plantas (VAN RAIJ, 1991). Esta hipótese é sustentada pelo fato do caupi inoculado em solo dessas áreas ter apresentado nodulação inferior ao caupi inoculado em areia estéril, que possuía acidez considerada adequada ao desenvolvimento das plantas ($\text{pH CaCl}_2 = 5,8$). Apenas as plantas florestais, adaptadas a estas condições, tiveram uma boa nodulação. Vários autores utilizam a calagem das amostras de solo antes do emprego das plantas iscas, como forma de atenuar os efeitos negativos do pH baixo (MELLONI et al., 2006), no entanto esta prática traz grandes alterações químicas (VAN RAIJ, 1991) e biológicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) no solo. Como a preocupação deste trabalho foi caracterizar a diversidade natural das áreas, preferiu-se não fazer a calagem, já que poderia causar uma pressão de seleção nos rizóbios, distorcendo a realidade das áreas. Desta forma, das plantas exóticas, apenas o caupi, considerado uma planta rústica em relação às outras (SILVA et al., 2006), conseguiu formar nódulos com inóculo de amostra de solo de uma das áreas. A área de floresta em regeneração foi a área na qual foi encontrada maior diversidade de leguminosas (Capítulo 2), o que pode ter favorecido uma maior diversidade de rizóbios e conseqüente nodulação do caupi com o inóculo de solo desta área.

O uso de solo autoclavado como testemunha foi inadequado, já que foi observado visualmente o crescimento de fungos na superfície das parcelas que receberam este substrato. Este fato pode ter sido um resultado da disponibilização da matéria orgânica contida nas amostras de solo para os microrganismos causados pela autoclavagem. Por este motivo o solo autoclavado foi substituído por areia:vermiculita como testemunha para as espécies florestais.

Das plantas florestais, apenas as de ocorrência natural próximo à área de coleta, bracatinga e maricá, formaram nódulos. Apesar do angico poder estar associado a Florestas de Araucária, sua ocorrência é predominante na região sul do país e não

foram encontrados relatos sobre sua ocorrência próximo à região de Campos do Jordão. Patreze e Cordeiro (2004), avaliando o crescimento de espécies florestais nativas em solo de Corumbataí, SP, em resposta à fertilização e inoculação de rizóbios e micorrizas, observaram que o maricá formou um número muito superior de nódulos em relação ao angico. Nos tratamentos que produziram maior número de nódulos foram observados menores tamanhos destes nódulos, sendo que, geralmente, nódulos pequenos possuem menor eficiência. Enquanto, em média, o maricá produziu entre 37.8 e 2252.2 nódulos, de acordo com o tratamento, o angico formou apenas de 5.8 a 13.2 nódulos. Sendo assim, a maior promiscuidade do maricá pode também ter sido a causa de seu sucesso como planta isca, em relação ao angico.

A bracatinga foi a leguminosa de maior ocorrência no Parque Estadual de Campos do Jordão, verificando-se sempre nodulação abundante (Capítulo 2). Sendo assim, seria esperado seu sucesso como planta isca, já que as áreas possivelmente apresentariam grande potencial de inóculo de rizóbios para esta espécie.

Não foi possível correlacionar a presença de nódulos com o aumento da matéria seca das plantas, visto que não se constatarem diferenças significativas. Os altos valores dos coeficientes de variação, variando de 20-70% para matéria seca e de 8.3 - 52.3% para número e massa de nódulos, resultantes da alta variabilidade dos dados, podem ter ocultado diferenças entre as áreas. Esta variabilidade pode ser explicada, em parte, pela forma de produção das sementes florestais, já que são coletadas de diferentes plantas e sabe-se que plantas diferentes geralmente apresentam variabilidade genética entre si. Outro ponto a ser considerado é que o solo não foi peneirado e restos vegetais presentes nas amostras de solos (como acículas) podem ter causado alelopatia maior em algumas parcelas do que em outras.

Identificação e diversidade das bactérias isoladas

A maioria das bactérias isoladas foi identificada como pertencente ao gênero *Burkholderia*, o que está em concordância com recentes trabalhos mostrando a presença destas bactérias como rizóbios de leguminosas tropicais, sendo denominados β -rizóbios (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2003; PARKER; BARRETT, 2006).

Também foram encontradas espécies do gênero *Ralstonia*, e este gênero também foi descrito como simbiótico em leguminosas (CHEN et al., 2003). No entanto, não foram encontrados α -rizóbios nas áreas de estudo. A predominância de β -rizóbios nas áreas amostradas pode estar relacionada à maior adaptabilidade destas bactérias às condições ambientais, em especial a *Burkholderia* spp., que é relacionada a crescimento em condições extremas (ZHANG et al., 2000), já que as áreas possuem solos com pH muito baixo, o que pode limitar a sobrevivência de α -rizóbios.

Através do uso de filogenia baseada no gene 16S rRNA pôde-se observar que *Burkholderia* sp3 está proximamente relacionada a *Burkholderia mimosarum* Br3454 (CHEN et al., 2006), estirpe de rizóbio que é recomendada para a bracatinga pela EMBRAPA (FARIA; FRANCO, 2002). *Xanthomonas* sp. e *Ralstonia* sp. estão relacionadas aos fitopatógenos *Xanthomonas campestris* e *Ralstonia solanacearum*, respectivamente. No entanto, bactérias similares a *Ralstonia* sp. foram caracterizadas recentemente como rizóbios, sendo renomeadas para *Cupriavidus* sp. (CHEN et al., 2003; PARKER; BARRETT, 2006). *Herbaspirillum* sp. e *Pseudomonas* sp. estão relacionadas a *Herbaspirillum seropedicae* e *Pseudomonas putida*, bactérias descritas como endofíticas de plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Vale ressaltar que foram utilizadas seqüências de 530 pb para a filogenia, o que pode tornar as árvores imprecisas, já que o gene 16S rRNA completo possui aproximadamente três vezes este tamanho.

Embora os α -rizóbios não tenham sido detectados através da utilização de plantas iscas, constatou-se a sua presença em nódulos de leguminosas coletadas no Parque Estadual de Campos do Jordão (Capítulo 3). É possível que as plantas iscas utilizadas não apresentaram homologia com os α -rizóbios presentes nas amostras de solo, apesar do caupi apresentar preferência por associação com *Bradyrhizobium* sp. (ODEE et al., 2002), principal gênero de α -rizóbio identificado nas plantas das áreas (Capítulo 3).

O isolamento de bactérias pertencentes aos mesmos grupos genotípicos obtidos no Capítulo 3 é um indício da homologia de *Burkholderia* spp. e *Pseudomonas* sp. com nódulos de leguminosas, mostrando consistência nos dados.

Utilizando-se o índice de diversidade de Shannon, o maricá mostrou-se como planta isca mais promíscua, seguido do caupi. A bracatinga, planta nativa das área de estudo, mostrou menor diversidade de grupos genotípicos, o que pode ser resultado da co-evolução desta espécie com *Burkholderia spp.*, tornando sua simbiose mais restrita.

Um ensaio de nodulação será necessário para identificar quais das bactérias isoladas são rizóbios (formadoras de nódulos), já que caracterizamos a diversidade total de bactérias presente nos nódulos, podendo ter sido isoladas bactérias oportunistas ou endofíticas. Caso parte destas não sejam rizóbios, a sua função nos nódulos ainda merece investigação, já que podem estar relacionadas ao crescimento das plantas e/ou à fixação biológica de nitrogênio.

Diversidade das bactérias isoladas nas áreas de estudo

Uma maior diversidade de bactérias isoladas dos nódulos foi proveniente da Floresta em Regeneração. Este fato pode estar associado a dinâmica da área em relação as outras, já que a floresta nativa pode ser considerada uma floresta em “clímax” e o reflorestamento com mais de cinquenta anos já está estabilizado, enquanto que a floresta em regeneração está se recuperando de uma queimada acidental ocorrida há cinco anos. Nesta área foi identificado um maior número de leguminosas em relação às demais áreas (Capítulo 2), o que pode ser a causa da maior diversidade de rizóbios.

A floresta nativa apresentou apenas espécies de *Burkholderia*, sendo que a área onde foi coletado o solo não estava relacionada à presença de leguminosas (parcela permanente do programa Biota, CARDOSO et al., 2004). Na área de reflorestamento de Araucária também houve ocorrência de rizóbios, estando relacionados predominantemente a *Burkholderia spp.*, apesar da área não possuir leguminosas hospedeiras há várias décadas, já que o reflorestamento foi estabelecido em 1959.

Pouco é conhecido sobre o hábito saprófita dos rizóbios, acreditando-se que podem sobreviver no solo por muitos anos sem espécies leguminosas hospedeiras, no entanto possuindo uma tendência em perder os genes relacionados à simbiose (SPRENT, 2001). A mesma autora discute a dificuldade em estabelecer o conceito de

rizóbio, já que as bactérias podem estar constantemente ganhando e perdendo genes, e uma bactéria que não é capaz de nodular leguminosas pode receber por transferência horizontal os genes simbióticos, tornando-se capaz.

É aceito que bactérias possuem uma tendência em perder genes não essenciais, sendo a simbiose uma relação genética muito específica (OCHMAN; MORAN, 2001). Pensando-se em áreas que não possuem leguminosas há décadas, torna-se difícil a formulação de hipóteses para a presença de bactérias capazes de nodular leguminosas, já que, teoricamente, neste tempo sem hospedeiro estas bactérias perderiam os genes responsáveis em realizar a simbiose. Uma explicação seria o tráfego de animais nas áreas, pois poderiam transportar rizóbios em solo aderido a seus corpos. No entanto o volume de solo e rizóbios seria pequeno para explicar o sucesso das plantas iscas maricá e bracinga no presente trabalho.

Discriminação das áreas por PCA

Utilizando-se a frequência de bactérias isoladas em cada área, e PCA, foi possível a observação da tendência de discriminação das áreas. A Floresta Preservada ficou relacionada à presença de *Burkholderia* spp, a Floresta em Regeneração ficou relacionada principalmente à presença de *Ralstonia* sp. e *Xanthomonas* sp. e a Floresta Plantada relacionada à presença de *Pseudomonas* sp., *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp.

Devido à semelhança dos atributos químicos do solo das áreas, não foi possível traçar relações entre estes dados e as espécies de bactérias, sugerindo que a diversidade de plantas e o manejo das áreas foram os atributos predominantes para explicar a diversidade das bactérias isoladas.

Diversidade de rizóbios como indicador de qualidade do solo

Apesar de ser defendido o uso da diversidade de bactérias como indicador da qualidade do solo, ainda não existem parâmetros definidos para este uso (ZILLI et al., 2003; KASCHUCK et al., 2005). Neste trabalho, apenas duas das seis plantas iscas

foram eficientes na recuperação de rizóbios das áreas, mostrando que além de parâmetros de índices de diversidade, a forma de isolamento do rizóbios também é essencial para seu uso como indicador. Para que diferentes trabalhos possam ser comparados, e os parâmetros sejam definidos, torna-se necessário a definição da forma de coleta de solo, da forma de correção química deste solo e das plantas iscas a serem utilizadas.

Quanto à coleta de solo é necessária a padronização da profundidade de coleta, sendo 20 cm a mais adequada (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994); da forma de processamento, sendo o peneiramento facilitador para a homogeneização da terra coletada, no entanto possível fonte de contaminação das amostras; e do armazenamento, devendo ser breve, já que pode-se perder diversidade com o tempo, sendo sugerido o prazo máximo de 15 dias antes do uso (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). A correção química do solo com calagem e adubação são fatores controvertidos já que podem alterar muito as características químicas e biológicas naturais do solo, prejudicando a caracterização da diversidade real. Por outro lado, a não utilização pode prejudicar o desenvolvimento das plantas-iscas utilizadas, dificultando ou impedindo a captura de rizóbios e também contribuindo para a diminuição da diversidade obtida para as áreas. Estes problemas podem ser resolvidos pela escolha das plantas iscas, podendo ser padronizado o uso de determinadas plantas para cada tipo de solo. Neste trabalho ficou evidente a maior eficiência de espécies florestais em capturar rizóbios, pois são adaptadas a solos ácidos com baixo nível de nutrientes minerais, em contraste com a ineficiência do uso de plantas de uso agrônômico, exigentes em pH e nutrientes minerais. Estes resultados trazem uma nova visão quanto ao uso de plantas iscas, sendo que enquanto trabalhos utilizam a adaptação do solo para o desenvolvimento das plantas (MELLONI et al., 2006), observou-se que é possível a escolha de plantas que se adaptem às condições do solo, trazendo maior confiabilidade dos resultados. Partindo deste princípio, pode também ser discutida a necessidade do uso de solução nutritiva nestes ensaios. Teoricamente as mudanças nas características do solo com o uso de solução nutritiva para irrigação tendem a ser mínimas, já que as soluções possuem concentrações de nutrientes e osmolaridade equilibradas, enquanto que a adubação e calagem consistem na utilização de uma quantidade muito superior de

nutrientes e corretivo de acidez, respectivamente, podendo trazer mudanças químicas e biológicas muito mais drásticas. No entanto, com o uso de plantas iscas adaptadas aos solos, apenas a irrigação com água já pode ser adequada para o desenvolvimento das plantas, diminuindo o impacto sobre a diversidade original de rizóbios do solo em estudo. Outro ponto a ser considerado quanto à escolha das plantas iscas é a homologia destas com os rizóbios, devendo ser analisada a sua escolha de acordo com sua capacidade em capturar rizóbios de diferentes grupos taxonômicos, fato este nem sempre conhecido.

Depreende-se que um dos principais fatores limitantes para o uso de rizóbios como indicador de qualidade de solo é a padronização do uso de plantas-iscas. Esforços devem ser tomados para a escolha das plantas de acordo com o solo e a homologia com diferentes grupos taxonômicos de rizóbios, de forma que possam ser usadas por diferentes grupos de pesquisa, tendo assim dados comparáveis.

No trabalho em discussão, o maricá se mostrou adequado como planta-isca para solos ácidos, no entanto capturando apenas β -rizóbios. Pode ser estudado o uso de *Galactia crassifolia* e *Collaea speciosa* como plantas iscas, já que são plantas de ocorrência natural no Parque Estadual de Campos do Jordão, apresentando assim adaptação a solos ácidos, sabendo-se que ao mesmo tempo estas espécies abrigam tanto α -rizóbios, como β -rizóbios.

Das bactérias isoladas com as plantas iscas, foram identificados seis grupos genotípicos, sendo que metade deles foi classificada como similar a gêneros de rizóbios conhecidos (*Burkholderia* sp2, *Burkholderia* sp3 e *Ralstonia* sp.).

Para avaliar a qualidade biológica do solo, deve ser pensado em redundância e resiliência metabólica dos isolados microbianos sendo que a diversidade de microorganismo pode estar ligada a estes dois fatores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em geral, é esperado que quanto maior a diversidade de microorganismos do solo, maior será a chance de um solo que sofreu distúrbios retornar ao seu equilíbrio metabólico, pois, apesar de que o distúrbio possa prejudicar a sobrevivência de algumas espécies de organismos de importância para o solo, uma alta diversidade pode favorecer que sejam selecionados outros organismos capazes de realizar a mesma função. Por exemplo, uma floresta em clímax pode ter sua entrada de nitrogênio muito

dependente de uma espécie de rizóbio, mas mudanças climáticas prejudicaram a sobrevivência desta espécie no solo, tornando seu inóculo no solo insuficiente para nodulação de leguminosas. Em um solo de alta diversidade poderá ser selecionada uma outra espécie de rizóbio, capaz de se desenvolver neste novo cenário climático e nessas leguminosas, sem prejudicar o ciclo do nitrogênio nesta floresta. Em um solo de baixa diversidade e com a impossibilidade de um substituto ao rizóbio hipotético, a entrada de nitrogênio no solo desta floresta poderia ser prejudicada, trazendo drásticas conseqüências. Apesar de reducionista, já que a importância deste rizóbio foi exagerada para melhor expressar a idéia, este exemplo elucida a importância do uso da diversidade de rizóbios como indicador da qualidade do solo. Com o mesmo raciocínio, será aceito o conceito de que uma maior diversidade de rizóbios está relacionada a uma melhor qualidade do solo.

Não foi possível ainda provar quais bactérias deste presente trabalho são realmente rizóbios. Assim, a diversidade total de bactérias isoladas dos nódulos será discutida como indicador da qualidade do solo.

Conforme exposto neste capítulo, a área de Floresta em Regeneração apresentou o maior índice de diversidade, enquanto a Floresta Preservada e a Floresta Plantada apresentaram índices semelhantes, sendo estes dois últimos considerados sistemas em equilíbrio. Tanto a Floresta Plantada quanto a Floresta em Regeneração são derivadas de uma Floresta Nativa que sofreu distúrbios, foi desmatada, havendo o replantio de araucárias. Apesar da maior diversidade florística da Floresta em Regeneração, se assemelhando mais à Floresta Nativa, o comportamento de diversidade de bactérias entre estas áreas foi distinto. Sendo assim, fica difícil estabelecer um critério de qualidade do solo, já que um solo considerado em recuperação apresentou maior diversidade que a floresta em clímax, do qual é derivado.

Estes dados refletem a complexidade dos sistemas naturais e a dificuldade do estabelecimento de padrões de qualidade para que comparações sejam realizadas. Não foram encontrados na literatura parâmetros práticos, como valores de índices de diversidade, para avaliação da qualidade de solo, havendo até o momento apenas conceituação teórica (ZILLI et al., 2003).

Para que a diversidade de rizóbios possa ser utilizada como indicador de qualidade de solo ainda serão necessários amplos estudos para o estabelecimento de áreas de referência e, a partir disso, o estabelecimento de valores de índices que auxiliem nas comparações.

No presente trabalho não foi possível resolver estes problemas, sendo que a utilização de apenas três áreas de comparação e duas plantas iscas que apresentaram eficiência para a captura de rizóbios pode ter sido limitante para o uso de dados de diversidade como indicadores de qualidade do solo.

4.3 Conclusões

Foram isoladas setenta e oito cepas, sendo constatado por análise filogenética que a maioria destas são taxonomicamente relacionadas à rizóbios.

Através da caracterização genotípica foram formados seis grupos, relacionados, respectivamente, aos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (dois grupos).

O maricá mostrou-se como planta isca de maior eficiência, seguido da bracatinga e do caupi.

A Floresta em Regeneração apresentou maior diversidade de bactérias isoladas pelas plantas iscas, enquanto que a Floresta Preservada e a Floresta Plantada apresentaram uma menor diversidade. Este fato pode estar relacionado à maior diversidade de leguminosas encontrada na Floresta em Regeneração.

O uso de rizóbios como indicador de qualidade de solo ainda não é possível. Para este uso é necessária a padronização da metodologia de isolamento dos rizóbios, tornando os resultados de diferentes pesquisadores comparáveis. Deve ocorrer uma padronização no uso de plantas iscas, após um amplo estudo de diferentes espécies, levando-se em consideração as características químicas dos solos amostrados. É necessário o estabelecimento de áreas de referência para que sejam estabelecidos valores de índices de diversidade para comparação.

Referências

- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, e *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, Feb. 2006.
- BERTALOT, M. J. A.; GUERRINI, I. A.; MENDOZA, E.; DUBOC, E.; BARREIROS, R. M.; CORRÊA, F. M. Retorno de nutrientes ao solo via deposição de serrapilheira de quatro espécies leguminosas arbóreas na região de Botucatu - São Paulo, Brasil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, p. 219-227, 2004.
- BOGINO, P.; BANCHIO, E.; RINAUDI, L.; CERIONI, G.; BONFIGLIO, C.; GIORDANO W. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 148, n. 3, p. 207-212, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. **ESPÉCIES FLORESTAIS BRASILEIRAS: Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm>. Acesso em: 23 fev. 2007.
- CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVNI-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen by β -Proteobacteria is widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, Dec. 2003.
- CHEN, W. M. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1847-1851, Aug. 2006.
- FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies arbóreas**. Seropédica: EMBRAPA, 2002. 16 p. (EMBRAPA. Documento, n. 158).
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia do Solo**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1996. p.202-203. (IAC. Boletim Técnico, 100).
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional system in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Columbus, v. 32, p. 210-220, Jan. 2006.
- LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 269p.

- MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.235-246, Mar./Abr. 2006.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, New York, v.411, p.948-950, Jun. 2001.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- OCHMAN, H.; MORAN, N. A. Genes lost and genes found: the molecular evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. **Science**, London, v. 292, p. 1096-1098, 2001.
- SANQUETA, C. R.; TETTO, A. F. **Pinheiro-do-Paraná: Lendas e realidades**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1999, 112 p.
- SEIBERT, P.; NEGREIROS, O.C.; BUENO, R.A.; EMMERICH, W.; MOURA NETTO, B.V.; MARCONDES, M.A.P.; CESAR, S.F.; GUILLAUMON, J.R.; MONTAGNA, R.A.A.; BARRETO, N.J.C.B.; GARRIDO, M.A.O.; MELLO FILHO, L.E.; EMMERICH, M.; MATTOS, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; GODOI, A. **Plano de manejo do Parque Estadual Campos de Jordão**. São Paulo: Instituto Florestal, 1975. 148p. (Boletim Técnico do Instituto Florestal, 19).
- SAS INSTITUTE. **SAS: User's guide: statistics**. Cary: Institute Inc. 6th ed. 2002.
- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, V. B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientiarum Agronomia**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 407-412, Jun. /Set. 2006.
- SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001, 146 p.
- VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991. 343 p.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodulate bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IPB. Handbook, 15).
- ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. da C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; YAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T. KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 743-749, 2000.

APÊNDICES

Apêndice A – Algumas das plantas coletadas no Parque Estadual de Campos do Jordão

(Continua)

Collaea speciosa *G. crassifolia* *Mimosa furfuracea* *Mimosa sp1*

Apêndice A – Algumas das plantas coletadas no Parque Estadual de Campos do Jordão
(Conclusão)

Mimosa scabrella

Collaea speciosa

Mimosa monticola

Mimosa pilulifera

Apêndice B – Parque Estadual de Campos do Jordão e as áreas de coleta

Entrada do Parque

Floresta Preservada

Floresta Plantada

Floresta em Regeneração

ANEXOS

Anexo A – Análise de agrupamento realizada para os isolados resultando em 6 grupos fenotípicos

Anexo B – Bactérias que foram utilizadas para filogenia e respectivas fontes de obtenção da sequência do gene 16S RNA

Estirpe	Banco de dados	Referência de acesso
<i>Actinomyces oricola</i>	RDP II	<i>Actinomyces oricola</i> (T); AJ507295
<i>Bradyrhizobium betae</i>	RDP II	<i>Bradyrhizobium betae</i> (T); AY372184
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	RDP II	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> (T); USDA 76; U35000
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	RDP II	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (T); S46916
<i>Burkholderia brasiliensis</i> M130	GenBank	<i>Burkholderia brasilienses</i> ; M130
<i>Burkholderia cepacia</i>	RDP II	<i>Burkholderia cepacia</i> (T); ATCC 25416T; U96927
<i>Burkholderia</i> sp. Br3454	GenBank	(CHEN et al., 2006)
<i>Burkholderia</i> sp. Hpud 12.1	GenBank	(BARRET; PARKER, 2006)
<i>Burkholderia terrae</i>	RDP II	<i>Burkholderia terrae</i> ; KMY01
<i>Burkholderia tropica</i>	RDP II	<i>Burkholderia tropica</i> (T); Ppe8; AJ420332
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	RDP II	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (T); TVV75 T; U96928
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	GenBank	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> ; LMG 19425 AF300325.1
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	RDP II	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (T); ATCC 35892; Y10146
<i>Pantoea agglomerans</i>	RDP II	<i>Pantoea agglomerans</i> (T); AB004691
<i>Pseudomonas putida</i>	RDP II	<i>Pseudomonas putida</i> (T); DSM 291T; Z76667
<i>Ralstonia solanacearum</i>	RDP II	<i>Ralstonia solanacearum</i> (T); ATCC 11696; X67036
<i>Rhizobium tropici</i>	RDP II	<i>Rhizobium tropici</i> (T); CIAT 899; USDA 9030; U89832
<i>Xanthomonas campestris</i>	RDP II	<i>Xanthomonas campestris</i> (T); LMG 876; X99299

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(continua)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
Mf13A250	feijoeiro	1	1	<i>Pantoea sp.</i>
Mi17A280		1	6	<i>Pantoea sp.</i>
Mp26A285	feijoeiro	1	6	<i>Pantoea sp.</i>
Ad13A244		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad13C241		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad13C242		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad13C243		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Gc11A151		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Gc21B138		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad11C165		2	1	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21C262		2	3	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21C263		2	3	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad23A271		2	3	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21A256		2	4	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21A257		2	4	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad23B254		2	4	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad23B255		2	4	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad23C258		2	4	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21B260		2	5	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad11C166		2	5	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad21B261	feijoeiro	2	6	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Ad23C259		2	6	<i>Bradyrhizobium sp1</i>
Cs31A161		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs31B162		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs31B163	feijoeiro	3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs31C164		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs41A158		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs41C155		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc21B140		3	1	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc11C141		3	2	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc11C142		3	2	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc11C143		3	2	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs41B157		3	3	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Mf13C253	feijoeiro	3	3	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc21C147		3	4	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Gc21C148		3	8	<i>Bradyrhizobium sp2</i>
Cs31C217		4	5	<i>Rhizobium sp.</i>
Cs31C218		4	5	<i>Rhizobium sp.</i>
Mf24A238	feijoeiro	5	5	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ms33A120		5	5	<i>Pseudomonas sp.</i>

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(continuação)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
Ms33A121		5	5	<i>Pseudomonas sp.</i>
Mf24A237	feijoeiro	5	6	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ms53B227	Ms 2	6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
Ms81A188	Ms 3	6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
Ms81C077		6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
Ms81C079		6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
Ms81C080		6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
M123C112		6	1	<i>Burkholderia sp1</i>
M131C248		6	2	<i>Burkholderia sp1</i>
Ms81A189	Ms 2	6	2	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs12A132		6	3	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs22A123		6	3	<i>Burkholderia sp1</i>
M131B220		6	3	<i>Burkholderia sp1</i>
M131C249	feijoeiro	6	3	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23C152		6	3	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs12A131		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs12B130	feijoeiro	6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs12C127		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs22B124		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs22B125		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs22C133	feijoeiro	6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs22C134		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23A073		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23A074		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23A075	feijoeiro	6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23A076		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23B200	feijoeiro	6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Mi23C153	feijoeiro	6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
Cs12C126		6	5	<i>Burkholderia sp1</i>
M111C277	Ms 2	6	6	<i>Burkholderia sp1</i>
Gc21A135		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc21A137	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc21C145	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
M131B221		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13A210	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13A211	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13B212	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13B213	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13C214	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13C215	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md13C216		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(continuação)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
Md21A208		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md21A209	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md21C205	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md21C206	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Md21C207	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp15A274	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp15A275	feijoeiro	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms53B226	Ms 3	7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc21A136		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc21B139		7	1	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17A281		7	2	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A282	feijoeiro	7	2	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A283		7	2	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf24B235	feijoeiro	7	3	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf24B236	feijoeiro	7	3	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17C092	feijoeiro	7	3	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17C094	feijoeiro	7	3	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17C091	feijoeiro	7	3	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc11B149	Ms 2	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc21C146		7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Md21C204	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23A266	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23A268	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23B239		7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23B240	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23C269	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23C270	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17A279		7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi23A201	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi23A202	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp15A276		7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A284		7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A286	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A287	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
M111C278	Ms 3	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi23A203	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23A265	feijoeiro	7	4	<i>Burkholderia sp2</i>
Mf23A267		7	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mi17B081		7	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mp26A288	feijoeiro	7	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Gc11A150		8	1	<i>Burkholderia sp3</i>

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(continuação)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
Ms63A231	Ms 2	8	1	<i>Burkholderia sp3</i>
Cs22A122		8	3	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63B228	Ms 2	8	4	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63B229	Ms 2	8	4	<i>Burkholderia sp3</i>
Gc11A170		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Gc11B174	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Gc11C144		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf24C234		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mi17B082	feijoeiro	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mi23B199	feijoeiro	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms33C116	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43A085	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms53C224	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63C103	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63C104	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63C105	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms71B179		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms71B181		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms71C184	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms71C185	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75A182	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75A183	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75B097	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75B098	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75B099	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75B100	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms75C186	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms81C078	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83A177	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83A178	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83B107	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83B108	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83C175	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms83C176	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85A197	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85A198	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85B196		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85C193		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85C194	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M111A084	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M111A102		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(continuação)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
M111B110	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M111B111	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M123A101		8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M123C113	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M123C114	Ms 3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
M123C115	Ms 2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
MX11A083	m2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43A086	m2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43A087	m2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43B089	m2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43B090	m3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf13B093	feijoeiro	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf13B095	feijoeiro	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf13B096	feijoeiro	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63C106	m2	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms71B180	m3	8	5	<i>Burkholderia sp3</i>
Gc11A169	feijoeiro	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf24C232		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mf24C233	feijoeiro	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms33B118		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms33B119		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms33C117	Ms 2	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43C222	Ms 3	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms43C223	Ms 2	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms53C225	Ms 2	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms63A230	Ms 3	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms81B190		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms81B191		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms81B192		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms85B195	Ms 2	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
MX11B109	m3	8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Gc11C171		8	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Cs41C154	feijoeiro	nd	1	nd
Cs41A159		nd	1	nd
Cs31A160		nd	1	nd
Mf13A251		nd	2	nd
Cs41B156		nd	3	nd
Ad13B247		nd	3	nd
Mf13C252		nd	3	nd
Ad21C264		nd	3	nd
Ms43B088		nd	5	nd
Ad13B246		nd	5	nd

Anexo C – Classificação das estirpes quanto a nodulação em feijoeiro ou bracatinga (Ms2 – 2 plantas, Ms3 - 3 plantas) grupos genotípicos (GG), grupos fenotípicos (GF) e taxonomia adotada. As estirpes foram ordenadas por GG

(conclusão)

Estirpe	Nodulação	GG	GF	Taxonomia adotada
Ad23A272		nd	5	nd
Ad23A273		nd	5	nd
Gc11C172		nd	6	nd
Gc11B173		nd	6	nd
Ms71C187		nd	6	nd
Ad13B219	feijoeiro	nd	6	nd

* nd = não disponível (estirpe morta ou sem sequência).

Anexo D – Análise estatística do experimento de nodulação em bracatinga, Tukey 5% analisado pelo programa SAS. Médias com a mesma letra não diferem entre si, número de repetições utilizadas (Rep) e tratamento utilizado (TRAT). Nos tratamentos os números se referem as estirpes, nit, ao controle adubado com nitrogênio e test, controle não inoculado nem adubado.

(continua)

		Média	Rep.	TRAT
	A	2.06250	2	nit
	B	0.16850	2	174
C	B	0.13850	2	224
C	B	0.13700	2	231
C	B	0.13650	2	99
C	B	0.12100	3	85
C	B	0.11000	2	100
C	B	0.10600	3	278
C	B	0.09767	3	177
C	B	0.09350	2	103
C	B	0.09300	3	114
C	B	0.09000	3	78
C	B	0.08833	3	175
C	B	0.08633	3	107
C	B	0.08600	2	87
C	B	0.08250	2	106
C	B	0.08167	3	230
C	B	0.08100	2	185
C	B	0.08000	2	104
C	B	0.07967	3	180
C	B	0.07667	3	194
C	B	0.07600	3	222
C	B	0.07450	2	111
C	B	0.07400	2	89
C	B	0.07300	2	115
C	B	0.07250	2	183
C	B	0.07000	2	97
C	B	0.06833	3	110
C	B	0.06600	3	226
C	B	0.06550	2	184
C	B	0.06500	3	84
C	B	0.06500	3	188
C	B	0.06400	2	98
C	B	0.06250	2	277
C	B	0.06200	2	229
C	B	0.06033	3	182
C	B	0.05950	2	test
C	B	0.05933	3	108

Anexo D – Análise estatística do experimento de nodulação em bracinga, Tukey 5% analisado pelo programa SAS. Médias com a mesma letra não diferem entre si, número de repetições utilizadas (Rep) e tratamento utilizado (TRAT). Nos tratamentos os números se referem as estirpes, nit, ao controle adubado com nitrogênio e test, controle não inoculado nem adubado.

(conclusão)

		Média	Rep. TRAT	
C	B	0.05900	3	116
C	B	0.05900	3	88
C	B	0.05800	2	225
C	B	0.05733	3	90
C	B	0.05567	3	109
C	B	0.05267	3	176
C	B	0.05050	2	186
C	B	0.04750	2	83
C	B	0.04400	3	113
C		0.04100	2	198
C		0.04067	3	197
C		0.03650	2	86

Anexo E – Análise estatística do experimento de nodulação em feijoeiro, Tukey 5% analisado pelo programa SAS. Médias com a mesma letra não diferem entre si, número de repetições utilizadas (Rep) e tratamento utilizado (TRAT). Nos tratamentos os números se referem as estirpes, nit, ao controle adubado com nitrogênio e test, controle não inoculado nem adubado.

(continua)

					Média	Rep.	TRAT
			A		1.3657	3	nit
	B		A		1.2489	3	96
	B		A	C	1.1606	3	205
	B	D	A	C	1.1199	3	204
E	B	D	A	C	1.0781	3	237
E	B	D	A	C	1.0646	3	203
E	B	D	A	C	1.0258	3	251
E	B	D	A	C	0.9114	3	219
E	B	D	A	C	0.8452	3	163
E	B	D	A	C	0.7794	3	253
E	B	D	A	C	0.6828	3	270
E	B	D	A	C	0.6382	3	169
E	B	D	A	C	0.6266	3	261
E	B	D	A	C	0.5765	3	211
E	B	D	A	C	0.5463	3	233
E	B	D	A	C	0.5439	3	269
E	B	D	A	C	0.5243	3	238
E	B	D	A	C	0.5209	3	212
E	B	D		C	0.5075	3	236
E	B	D		C	0.4957	3	287
E	B	D		C	0.4794	3	249
E	B	D		C	0.4669	3	130
E	B	D		C	0.4660	3	240
E	B	D		C	0.4650	3	288
E	B	D		C	0.4563	3	test
E	B	D		C	0.4482	3	145
E	B	D		C	0.4479	3	133
E	B	D		C	0.4275	3	153
E	B	D		C	0.4241	3	214
E	B	D		C	0.4154	3	274
E	B	D		C	0.4146	3	286
E		D		C	0.3872	3	275
E		D		C	0.3777	3	213
E		D		C	0.3633	3	285
E		D		C	0.3633	3	265
E		D		C	0.3463	3	210

Anexo E – Análise estatística do experimento de nodulação em feijoeiro, Tukey 5% analisado pelo programa SAS. Médias com a mesma letra não diferem entre si, número de repetições utilizadas (Rep) e tratamento utilizado (TRAT). Nos tratamentos os números se referem as estirpes, nit, ao controle adubado com nitrogênio e test, controle não inoculado nem adubado.

			(conclusão)		
			Média	Rep.	TRAT
E	D	C	0.3288	3	199
E	D	C	0.3251	3	137
E	D	C	0.3231	3	94
E	D	C	0.3204	3	95
E	D	C	0.3059	3	201
E	D		0.3007	3	93
E	D		0.2974	3	200
E	D		0.2825	3	268
E			0.2621	3	235
E			0.2620	3	266
E			0.2577	3	207
E			0.2541	3	154
E			0.2513	3	92
E			0.2477	3	75
E			0.2458	3	82
E			0.2420	3	215
E			0.2410	3	91
E			0.2404	3	209
E			0.2401	3	206
E			0.2297	3	250
E			0.2284	3	202
E			0.2252	3	282

Anexo F – Bactérias isoladas, áreas de que foram isoladas (PR – floresta preservada, RE – floresta em regeneração e PL – floresta plantada), grupos genotípicos (GG) e taxonomia adotada para cada grupo genotípico.

(continua)

Estirpe *	Área	GG	Taxonomia adotada
Mb301PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb302PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb303PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb334RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb335RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb336RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb337RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb338RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb339RE	RE	4	<i>Herbaspirillum sp.</i>
Mb340RE	RE	2	<i>Xanthomonas sp.</i>
Mb341RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb342RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb343RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb344PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb345PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb346PL	PL	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb347PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb348PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb349PL	PL	4	<i>Herbaspirillum sp.</i>
Mb350PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb351PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb352PL	PL	4	<i>Herbaspirillum sp.</i>
Mb353PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb354PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb355PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb356PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb357PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb358PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb359PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb360PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb361PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Mb362PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb363PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Mb364PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>

Anexo F – Bactérias isoladas, áreas de que foram isoladas (PR – floresta preservada, RE – floresta em regeneração e PL – floresta plantada), grupos genotípicos (GG) e taxonomia adotada para cada grupo genotípico.

(continua)

Estirpe *	Área	GG	Taxonomia adotada
Ms289PR	PR	6	Burkholderia sp3
Ms290PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms291PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms292PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms293PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms294PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms295PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms296PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms297PR	PR	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms298PR	PR	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms299PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms300PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms307RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms308RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms311RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms312RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms313RE	RE	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms314RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms315RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms316PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms317PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms319PL	PL	1	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ms320PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms322PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms323PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms324PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms325PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms326PL	PL	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms327PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms328PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms329PL	PL	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms330PL	PL	6	<i>Burkholderia sp3</i>
Ms331PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Ms332PL	PL	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Vu33RE	RE	3	<i>Ralstonia sp.</i>

Anexo F – Bactérias isoladas, áreas de que foram isoladas (PR – floresta preservada, RE – floresta em regeneração e PL – floresta plantada), grupos genotípicos (GG) e taxonomia adotada para cada grupo genotípico.

(conclusão)

Estirpe *	Área	GG	Taxonomia adotada
Vu41RE	RE	1	<i>Pseudomonas sp.</i>
Vu57RE	RE	3	<i>Ralstonia sp.</i>
Vu59RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Vu60RE	RE	3	<i>Ralstonia sp.</i>
Vu62RE	RE	3	<i>Ralstonia sp.</i>
Vu65RE	RE	3	<i>Ralstonia sp.</i>
Vu66RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Vu67RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>
Vu68RE	RE	5	<i>Burkholderia sp2</i>

* O código corresponde a: Planta isca utilizada (duas primeiras letras – Vu, *Vigna unguiculata*, Ms, *Mimosa scabrella* e Mb, *Mimosa bimucronata*), seguido do número de estocagem e área em que foi isolada (RE – floresta em regeneração, PL – floresta plantada e PR – floresta preservada).