



**KALIANE SÍRIO ARAÚJO**

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E IDENTIFICAÇÃO  
DE ESTIRPES DE *Burkholderia* ORIUNDAS  
DE CAMPOS RUPESTRES**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**KALIANE SÍRIO ARAÚJO**

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE  
*Burkholderia* ORIUNDAS DE CAMPOS RUPESTRES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

Dra. Fernanda de Carvalho

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Araújo, Kaliane Sírío.

Eficiência simbiótica e identificação de estirpes de *Burkholderia*  
oriundas de campos rupestres / Kaliane Sírío Araújo. – Lavras :  
UFLA, 2014.

126 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 2. Beta-proteobactérias. 3.  
Leguminosas. 4. Serra do Espinhaço. 5. Área degradada –  
Recuperação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.41

**KALIANE SÍRIO ARAÚJO**

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE  
*Burkholderia* ORIUNDAS DE CAMPOS RUPESTRES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 5 de março de 2014.

Dra. Krisle da Silva

EMBRAPA RORAIMA

Dra. Ligiane Aparecida Florentino

UNIFENAS

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dra. Fernanda de Carvalho

Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2014**

*A Deus, pela constante presença em minha vida. A minha amada mãe, um exemplo de integridade, perseverança e superação. Ao meu pai (in memoriam).  
Aos meus irmãos e amigos, pelo apoio, companherismo, incentivo e carinho.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Ciências do Solo, pelas instalações e na figura das pessoas, todos os funcionários, professores e colegas do curso de pós-graduação, que me receberam com respeito, pelos ensinamentos e agradável convivência.

À minha orientadora, professora Dra. Fatima Maria de Souza Moreira e à minha coorientadora, Dra. Fernanda de Carvalho, pela oportunidade, pelos ensinamentos e confiança.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto Biodiversidade de bactérias que formam simbiose com leguminosas e de outros diazotróficos em ecossistemas brasileiros. Projeto PRP/UFLA 0433/03. CNPq 304 974/2010-4.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Krisle da Silva e Dra. Ligiane A. Florentino, pela disponibilidade, contribuições e sugestões apresentadas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, pelos ensinamentos, auxílio no cumprimento das atividades, pelo apoio, conselhos, incentivo e amizade.

Ao Teotônio, pelas orientações e contribuições ao trabalho; a Mariana Gonçalves e Paula Assis, pela ajuda na condução do experimento e ao professor Marco Aurélio e a sua esposa Andréa, pelo auxílio e ótima convivência.

Aos funcionários Marlene e Manuel, pela contribuição, além do apoio, incentivo, paciência e amizade.

Aos amigos da Associação dos Pós-Graduandos da UFLA, Marco Aurélio, Marínéz, Elaine, Felipe, Juliana, Wesley, Noely, Fabiana e Lucas, pelos ensinamentos e ótima convivência.

À minha família lavrense: Juliana, Rodrigo, tia Maria, Rayssa, Estephane, Érica, Nathalia, Nayara, Larissa, Nilo, Fifo, Luan, Volmar, Fernando, Maru, Camila, Dino, Lívia, Guilherme, Sirley, Kize, Jessé, Tida e Lara, Diogo, Emmanuelle e Sophia, e minhas companheiras de república, Maiara, Hellen e Emmanuelle, pelo apoio, pelos momentos maravilhosos e o carinho.

A todos os amigos adquiridos no decorrer de minha vida, durante a minha passagem pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial Dr. Aldo, Dr. Harllen, Sr. João e Celma Cardoso, pelo apoio, incentivo, conselhos e carinho.

A minha companheira, amiga, referência e mãe, Gisélia Sírio Araújo, por todo amor, dedicação e ensinamentos; ao meu pai, Lauro Conceição Araújo (*in memoriam*), que sempre estará comigo; aos meus irmãos, Katiane Sírio Araújo e Kalisson Rodrigo Sírio Araújo, pelo incentivo e companherismo, e ao meu tio Cosme Vieira Sírio (*in memoriam*), pela compreensão, incentivo e carinho.

O saber a gente aprende com os mestres e os livros.  
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.

## RESUMO GERAL

O campo rupestre é um ecossistema que abriga vários tipos de vegetação e uma grande biodiversidade de plantas endêmicas, sendo considerado um dos locais prioritários à conservação. Entretanto, esse ecossistema vem sofrendo perturbações antropogênicas, causando sua degradação, levando à perda da diversidade, incluindo as populações de plantas e da microbiota do solo. Dessa forma, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar estirpes de *Burkholderia* quanto à capacidade de nodulação e eficiência simbiótica nas espécies de *Macropodium atropurpureum* (DC.), *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa* e identificar bactérias oriundas de solos de campo rupestres, isoladas das plantas isca *Macropodium atropurpureum* (DC.) e *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir.). Do total de 51 estirpes, 15 pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram autenticadas e testadas quanto à eficiência simbiótica em *M. atropurpureum* e em duas espécies nativas do Domínio Cerrado (*M. foliolosa*) e Atlântico (*M. bimucronata*), em condições de casa de vegetação. Para a realização de ensaios de autenticação e eficiência simbiótica das estirpes em estudo em *M. atropurpureum*, utilizaram-se garrafas recicladas do tipo *long neck* (500 mL), contendo solução nutritiva, tendo como controles os tratamentos sem inoculação, com e mínima concentração de nitrogênio mineral, e a estirpe de referência UFLA 04-212, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, por um período de 40 dias. Os experimentos em *M. bimucronata* e *M. foliolosa* foram realizados em tubetes (240 mL) contendo areia e vermiculita (1:2), sendo os controles as respectivas estirpes de referência na fixação biológica do nitrogênio, BR 3460 e UFLA 01-750, e os tratamentos com nitrogênio e mínima concentração de nitrogênio, como descrito anteriormente, em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, por um período de 70 dias. Após este período, foram avaliadas as seguintes características: altura da planta, diâmetro, número de nódulos, matéria seca da parte aérea e dos nódulos, matéria seca da raiz, matéria seca total, eficiência relativa e, no caso das espécies arbóreas, o índice de qualidade de Dickson. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias, por meio do teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. As 35 estirpes restantes foram identificadas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. Das estirpes de *Burkholderia* avaliadas, apenas UFLA 01-726 e UFLA 04-248 foram capazes de nodular *M. atropurpureum*, entretanto, todas foram ineficientes na fixação biológica de nitrogênio e na promoção de crescimento vegetal. Todas as estirpes de *Burkholderia* testadas estabeleceram simbiose com *M. bimucronata* e 12 estirpes nodularam *M. foliolosa*. As estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 foram eficientes na fixação

biológica do nitrogênio em *M. bimucronata*. Para a espécie *M. foliolosa*, as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750 e UFLA 01-751 obtiveram valores significativos quanto ao índice de qualidade de Dickson. As estirpes dos diferentes grupos culturais foram identificadas, com 98% a 100% de similaridade, como pertencentes aos gêneros *Bacillus* (13 estirpes), *Burkholderia* (13 estirpes), *Brevibacillus* (4 estirpes), *Paenibacillus* (3 estirpes), *Stenotrophomonas* (1 estirpe) e *Lysinibacillus* (1 estirpe). As estirpes de *Burkholderia* que foram capazes de nodular não apresentaram eficiência simbiótica em *M. atropurpureum*, mas induziram maior nodulação e atuaram na promoção do crescimento vegetal e na qualidade das mudas das espécies de *Mimosa* em estudo. As características morfológicas e culturais utilizadas como parâmetro para o agrupamento das estirpes subestimaram a diversidade genética das mesmas

Palavras-chave: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio. Beta-proteobactérias. Leguminosas. Serra do Espinhaço. Cerrado. Recuperação de Áreas Degradadas.

## GENERAL ABSTRACT

Rocky field is an ecosystem that holds several kinds of vegetation as well as a great diversity of endemic plants, and it is considered one of the major preservation sites. However, this ecosystem has undergone anthropogenic disturbances, which causes degradation and loss of diversity including plant population and soil microbiota. Thus, this study was conducted to evaluate strains of *Burkholderia* as the nodulation and symbiotic efficiency in species *Macropodium atropurpureum* (DC.), *Mimosa bimucronata* and *Mimosa foliolosa* and identify bacteria from soil to rocky field, isolated from bait plants *Macropodium atropurpureum* (DC.) and *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir.). From a total of 51 strains, 15 belonging to the genus *Burkholderia* were authenticated and tested as symbiotic efficiency in *M. atropurpureum* and in two native species of the Cerrado Domain (*M. foliolosa*) and Atlantic (*M. bimucronata*) in greenhouse conditions. For performing tests the authentication and symbiotic effectiveness of the strains in study in *M. atropurpureum*, it was used recycled bottles of type long neck (500 mL) containing nutrient solution has as control the treatments with no inoculation and with the minimum mineral nitrogen concentration and reference strain UFLA 04-212 in a completely randomized design with three replications for 40 days. The trials in *M. bimucronata* and *M. foliolosa* were performed in tubes (240 mL) with sand and vermiculite (1:2). Controls were the respective reference strains in biological nitrogen-fixing BR 3460 and UFLA 01-750 and treatments with nitrogen and minimum nitrogen concentrations, as described above, in a completely randomized design with six replicates for 70 days. After these period, were evaluated the following characteristics: plant height, diameter, nodules number, dry weight of shoots and nodules, dry weight of roots, total dry weight, relative efficiency, and for arboreal species, the Dickson quality index. Data were subjected to variance analysis and comparison of averages by Scott Knott test at 5% of probability. The remaining 35 strains were identified based on 16S rRNA gene. *Burkholderia* strains evaluated, only UFLA 01-726 and UFLA 04-248 were able to nodular *M. atropurpureum*, however, all were ineffective in biological nitrogen fixation and plant growth promotion. All *Burkholderia* strains have established symbiosis with *M. bimucronata* and 12 strains nodulated *M. foliolosa*. The strains UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 and UFLA 04-405 were efficient in biological nitrogen-fixing in *M. bimucronata*. For *M. foliolosa* species, the strains UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750, UFLA 01-751 obtained significant values regarding Dickson quality index. Strains of different cultural groups were identified, with 98% to 100% similarity,

as belonging the genus *Bacillus* (13 strains), *Burkholderia* (13 strains), *Brevibacillus* (4 strains), *Paenibacillus* (3 strains), *Stenotrophomonas* (1 strain) and *Lysinibacillus* (1 strain). *Burkholderia* strains that were capable of nodular showed no symbiotic efficiency in *M. atropurpureum*, but induced higher nodulation and acted in promoting plant growth and seedlings quality of *Mimosa* species studied. The morphological and cultural characteristics used as a parameter for the grouping of strains underestimated the genetic diversity of the same.

**Keywords:** Nitrogen-fixing bacteria. Beta-proteobacteria. Leguminous. *Serra do Espinhaço*. Cerrado. Recovery of Degraded Areas.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Diferenças quanto às características de crescimento apresentadas pelas plantas de *Macropodium atropurpureum*, nos diferentes tratamentos em resposta à eficiência na fixação biológica do nitrogênio (A.) (B.). Dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral, o tratamento com a estirpe de referência, UFLA 04-212, o tratamento com a estirpe UFLA 01-726 (1A.) e UFLA 04-248 (1B.). Presença de nódulos nos tratamentos com a estirpe utilizada como referência e que apresentou eficiência simbiótica UFLA 04-212 (C.) e nos tratamentos com as estirpes UFLA 01-726 (D.) e UFLA 04-248 (E.) que, apesar de conterem nódulos em suas raízes, não obtiveram eficiência simbiótica na fixação biológica do nitrogênio .....81
- Figura 2 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g), com coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 45,27%, 23,30%, 31,34%, de *Macropodium atropurpureum*, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral.\*Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. 83
- Figura 3 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), com coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 46,41% e 67,50%, em *Mimosa bimucronata*, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação da estirpe), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....85
- Figura 4 Altura e diâmetro do coleto em *Mimosa bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 26,52% e 16,64%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....87

- Figura 5 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g) de *Mimosa bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 43,16%, 48,84% e 43,26%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....89
- Figura 6 Índice de Qualidade de Dickson (IQD) em *Mimosa bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv) igual a 37,38%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....90
- Figura 7 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) em *Mimosa foliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv), respectivamente, iguais a 62,36% e 71,64%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....92
- Figura 8 Altura e diâmetro do coletado em *Mimosa foliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv) respectivamente iguais a 21,27% e 27,44%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....94
- Figura 9 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g) de *Mimosa foliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv), respectivamente, iguais a 35,03%, 46,57% e 33,97%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a

	identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em <i>M. foliolosa</i> em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. *Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.....	96
Figura 10	Índice de qualidade de Dickson, em <i>Mimosa foliolosa</i> , tendo coeficiente de variância (cv) igual a 42,56%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em <i>M. foliolosa</i> em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. *Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade .....	98
Figura 11	Relação filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA de estirpes isoladas de nódulos de <i>Macropitium atropurpureum</i> (siratro) e <i>Mimosa tenuiflora</i> (de Carvalho, 2010) e testada a eficiência simbiótica em <i>M. bimucronata</i> , <i>M. foliolosa</i> e siratro. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o método Neighbour-Joining, pelo programa MEGA 6, aplicando-se <i>bootstrap</i> com um mínimo de 1.000 replicações.....	107
Figura 12	Presença de nódulos com o interior vermelho, após 70 dias da inoculação das estirpes de <i>Burkholderia</i> nas raízes de <i>Mimosa foliolosa</i> .....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupo cultural, código de identificação, local de origem e planta hospedeira das estirpes em estudo (de Carvalho, 2010).....	66
Tabela 2	Especificação das 15 estirpes de <i>Burkholderia</i> utilizadas em ensaios de autenticação e eficiência simbiótica na fixação biológica de nitrogênio em <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Mimosa bimucronata</i> e <i>Mimosa foliolosa</i> , mais a estirpe UFLA 01-750, utilizada como referência para capacidade de nodulação em <i>M. foliolosa</i> (de Carvalho, 2010) .....	73
Tabela 3	Identificação das estirpes dos diferentes grupos culturais, baseada nas sequências mais similares encontradas no Genbank (NCBI) ...	100

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	17
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Campo rupestre</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Importância econômica e ambiental das leguminosas em geral, com ênfase em <i>Macropitium atropurpurem</i>, <i>Mimosa bimucronata</i> e <i>Mimosa foliolosa</i></b> .....	21
<b>2.2.1</b>	<b><i>Macropitium atropurpureum</i> (DC.) Urb</b> .....	24
<b>2.2.2</b>	<b><i>Mimosa bimucronata</i> (De Candole) Otto Kuntze</b> .....	27
<b>2.2.3</b>	<b><i>Mimosa foliolosa</i> Benth. subsp . <i>pachycarpa</i> (Benth.)</b> .....	29
<b>2.3</b>	<b>Bactérias fixadoras de nitrogênio</b> .....	31
<b>2.4</b>	<b>O gênero <i>Burkholderia</i> e sua relação simbiótica com as leguminosas <i>Mimosa</i> spp.</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	59
	<b>ARTIGO 1 Eficiência simbiótica de estirpes de <i>Burkholderia</i> em leguminosas e identificação de estirpes oriundas de campos rupestres</b> .....	59

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Os campos rupestres estão inseridos no bioma Cerrado e situados, principalmente, ao longo da Cadeia do Espinhaço, desde o norte da Chapada Diamantina, na Bahia, até a Serra de Ouro Branco, em Minas Gerais (GIULIETTI; PIRANI, 1988; ALVES; KOLBELK, 1994; ALVES; KOLBELK, 2010; HARLEY, 1995; GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; ALVES; CARDIN; KROPF, 2007, RAPINI et al., 2008).

Este ecossistema abriga vários tipos de vegetação e grande biodiversidade, além de alto endemismo, sendo considerado um dos locais prioritários para conservação (RAPINI et al., 2008; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; CARVALHO et al., 2012). Entretanto, esse ecossistema vem sofrendo perturbações antropogênicas, causando sua degradação, levando à perda da diversidade, incluindo as populações de plantas e da microbiota do solo.

Dentre as famílias de plantas existentes, a Leguminosae se destaca pela importância econômica, florestal e ambiental nos variados ecossistemas (FRANCO; RESENDE; CAMPELLO, 2003). Uma espécie vegetal de ampla relevância é a *Mimosa foliolosa*, principalmente por ser uma espécie endêmica de campo rupestre da região da Serra do Espinhaço no Brasil (GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997), adaptada a condições edáficas de baixa fertilidade e escassez de água (WHELAN, 1995; RIBEIRO; FERNANDES, 2000; NEGREIROS et al., 2011), além de apresentar boa produção de sementes e capacidade de germinação (Silveira et al., 2005; Silveira; Fernandes, 2006; NEGREIROS et al., 2009).

Das espécies vegetais utilizadas na recomposição florística de uma determinada área impactada, a *Mimosa bimucronata* (DC) Kuntze apresenta

grande emprego, por ser uma espécie pioneira, adaptada a terrenos úmidos e rochosos, capaz de controlar processos erosivos e estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (LORENZI, 2002; SPRENT, 2001; PATREZE; CORDEIRO, 2004; CHEN et al., 2007).

A relação simbiótica entre bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular e leguminosas pode variar de altamente específica ou ser promíscua, quando a planta é capaz de estabelecer simbiose com ampla diversidade de bactérias (MOREIRA, 2008). A espécie *Macropodium atropurpureum* (DC.) é considerada uma hospedeira promíscua e, por isso, é comumente utilizada em estudos de captura e diversidade de bactérias em uma determinada área (GONÇALVES; MOREIRA, 2004; MOREIRA et al., 2006; FLORENTINO et al., 2009), além de ser uma das principais espécies forrageiras, persistentes em diferentes tipos de solos e condições de estresse (JONES; MANNETJE, 1992).

Atualmente, estudos vêm sendo realizados com a finalidade de entender a relação simbiótica entre bactérias do gênero *Burkholderia* e as leguminosas *Macropodium atropurpureum* (DC.) (MOULIN et al., 2001; ELLIOT et al., 2007; ANGUS et al., 2013) e as espécies de *Mimosa* (VANDAMMEL et al., 2002; CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008; REIS et al., 2004; BONTEMPS et al., 2010; MISHRA et al., 2011), bem como a seleção de estirpes eficientes e com potencial biotecnológico.

Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar estirpes de *Burkholderia* quanto à capacidade de nodulação e à eficiência simbiótica nas espécies de *Macropodium atropurpureum* (DC.), *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa*, e identificar bactérias oriundas de solos de campo rupestres, isoladas das plantas iscas *Macropodium atropurpureum* (DC.) e *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir.).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Campo rupestre

O campo rupestre ocorre, geralmente, em altitudes a partir de 900 m e abriga formações herbáceo-arbustivas em montanhas, cujas rochas são de origem pré-cambriana, remodeladas por movimentos tectônicos a partir do Paleógeno, associadas, principalmente, a afloramentos de quartzito, arenito e minério de ferro (GIULIETTI; PIRANI, 1988; ALVES; KOLBELK, 1994; GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; CAIAFA; SILVA, 2005; ALVES; CARDIN; KROPF, 2007).

As áreas de campos rupestres estão situadas, principalmente, ao longo da cadeia do Espinhaço, estendendo-se desde o centro-sul de Minas Gerais até o norte da Chapada Diamantina, na Bahia (GIULIETTI; PIRANI, 1988, ALVES; KOLBELK, 1994; ALVES; KOLBELK, 2010, HARLEY, 1995; GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; ALVES; CARDIN; KROPF, 2007, RAPINI et al., 2008). No Brasil existem, também, outras áreas ditas “rupestres” ou “campos rupestres”, tais como a Serra dos Carajás, no Pará, cuja vegetação cresce sobre canga (SILVA; SECCO; LOBO, 1996), e a Serra da Jiboia, no leste da Bahia, onde os campos rupestres ocorrem sobre substrato gnáissico-granítico (QUEIROZ; SENA; COSTA, 1996).

O campo rupestre, localizado na Serra do Cipó, porção sul da Cadeia do Espinhaço, é composto por distintos habitats, como afloramento rochosos, brejos turfosos, brejos arenosos, campos pedregosos e cerrados, os quais são delimitados segundo as características da superfície do solo e limites de vegetação (CARVALHO, 2010).

Os solos de campos rupestres de diferentes tipos de fitofisionomias da Serra do Cipó são oligotróficos e ácidos e estão sujeitos a oscilações diárias de

temperatura, exposições ao vento e restrições hídricas, e a vegetação é xeromorfa, cujas plantas apresentam grande capacidade de fixação ao substrato, tolerância à dessecação e resistência ao estresse hídrico (GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997).

A heterogeneidade de substrato, a topografia e o microclima compõem a grande diversidade e endemismo de plantas, com uma distribuição descontínua entre os microambientes do campo rupestre do Brasil (CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002; CONCEIÇÃO, PIRANI, 2005; ALVES; KOLBEK, 1994; GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997; ALVES; KOLBEK, 2010; de Carvalho et al., 2012).

Em estudos realizados por Carvalho (2010) e Carvalho et al. (2012), na Serra do Cipó, em cinco distintos habitats, os quais foram delimitados pelas características da superfície do solo e limites de vegetação que compõem o mosaico de campo rupestre, verificou-se que a densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares é significativamente maior nos campos pedregosos em relação aos encontrados nos afloramentos rochosos, brejos turfosos, cerrado e brejos arenosos. Entretanto, em relação às bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas, a maior diversidade pode ser atribuída ao hábitat cerrado e brejo turfoso, seguido do campo pedregoso, afloramento rochosos e brejos arenosos.

No entanto, este ecossistema tem sofrido grandes alterações, devido à intensificação das práticas agrícolas, ao abandono da terra, às espécies invasoras e às atividades extrativas e de mineração, nas quais o processo de sucessão natural é lento (BRADSHAW, 1997; DAVIS et al., 1985; GIBSON, 2009).

Em estudos realizados ao longo da cadeia do espinhaço observou-se menor variabilidade genética e morfológica em populações de plantas, decorrente da interferência humana (GOMES et al., 2004; PEREIRA; BORBAL; GIULIETTI, 2007; RIBEIRO et al., 2007). A flora de campos

rupestres é constituída por espécies microendêmicas e, muitas vezes, são representadas por pequenas populações, o que a torna mais suscetível à ação natural ou antrópica e, por isso, necessita de uma proteção especial, com várias unidades de conservação que possam ser representativas de toda a heterogeneidade biológica regional (BURMAN, 1991; FUNCH; HARLEY, 2007).

A manutenção deste ecossistema não é só importante do ponto de vista da conservação da biodiversidade, mas também para garantir o bom funcionamento de determinados serviços envolvidos, tais como o aumento da qualidade da água e a diminuição da erosão do solo (OSBORNE; KOVACIC, 1993; BERGER; REY, 2004).

Le Stradic et al. (2013), ao reintroduzirem mudas de espécies arbóreas e arbustivas em áreas degradadas localizadas na porção sul da Cadeia do Espinhaço, na reserva particular Vellozia, na zona de amortecimento da Serra do Cipó, verificaram que as espécies arbustivas com maior sobrevivência permitiram o reestabelecimento de uma cobertura herbácea de sub-bosque, o que pode ter favorecido o aumento do controle da erosão do solo.

Assim, a restauração ecológica tem como finalidade a recuperação intencional dos ecossistemas degradados, bem como o reparo dos seus processos e serviços, e o restabelecimento da integridade biótica (THE SER INTERNATIONAL PRIMER ON ECOLOGICAL RESTORATION, 2004).

## **2.2 Importância econômica e ambiental das leguminosas em geral, com ênfase em *Macroptilium atropurpurem*, *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa***

A família Leguminosae, de distribuição cosmopolita, compreende um número estimado de 20.000 espécies em 727 gêneros, divididas entre as

subfamílias *Papilionoideae*, *Mimosoideae* e *Caesalpinoideae*, das quais a subfamília *Caesalpinoideae* compreende 2.250 espécies; a *Mimosoideae*, 3.270 espécies e a *Papilionoideae*, 13.800 espécies (LEWIS et al., 2005). Cada uma dessas famílias tem características peculiares que facilitam sua identificação no campo (SOUZA; LORENZI, 2005).

A Leguminosae é uma família composta por espécies de todos os tipos de hábito, como arbóreo, arbustos, herbáceas e lianas, e também apresenta ampla importância econômica e ecológica, sendo empregada como uma estratégia para a garantia da sustentabilidade (FRANCO; RESENDE; CAMPELLO, 2003). Dentro dessa família existem muitas espécies de importância socioeconômica devido à exploração da madeira; à produção de óleos, resinas e frutos e à produção e à comercialização de grãos, como, por exemplo, da soja e do feijão, além de espécies que são exploradas como forrageiras, sendo, portanto, fonte de emprego e geração de renda (GRAHAM; VANCE, 2003).

Em outros estudos foi demonstrada a utilização de leguminosas na adubação verde, pois elas favorecem a fertilidade do solo, melhoram a ciclagem e a disponibilização de nutrientes para as plantas após a mineralização dos resíduos, como o de Matos et al. (2011), ao testarem *Arachis pintoii*, *Calopogonium mucunoides*, *Stizolobium aterrimum* e *Stylosanthes guianensis* em sistemas cafeeiros e o de Matos et al. (2008), que estudaram a produção de biomassa e acúmulo de nutrientes de *A. pintoii*, *C. mucunoides*, *S. aterrimum* e *S. guianensis* como adubo verde, bem como o potencial das mesmas no processo de mineralização de C e N.

Segundo Dobereiner (1984), a grande maioria das espécies que compõem a família das leguminosas é arbórea, e muitas não são capazes de formar nódulos. Uma pequena parte das leguminosas estudadas é conhecida em relação à capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio, entretanto, é necessária a realização de estudos no campo, em casa de vegetação e em viveiro,

para verificar a capacidade de nodulação de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Espécies de leguminosas florestais vêm sendo avaliadas em processos de restauração de solos degradados pela agricultura, pela pastagem ou pela mineração, devido à capacidade que elas têm de obter nitrogênio pela simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, contribuindo para o estabelecimento de ecossistemas florestais e a aceleração da sucessão natural (FRANCO; FARIA, 1997).

Lima et al. (2009) estudaram as comunidades de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) em solos de diferentes sistemas de uso da terra (SUTs), usando siratro como planta isca. Estes autores observaram maior formação de número de nódulos na planta isca em amostra de solo de sistemas de agrofloresta e de agricultura em relação à amostra de solo de floresta, sugerindo que a alta nodulação e a diversidade presente nestes sistemas de manejos são decorrentes da alta capacidade de resiliência da comunidade de BNL em relação às mudanças provenientes do uso da terra após o desmatamento.

Um estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular leguminosas, utilizando, como plantas iscas, *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urban (Siratro) e *Mimosa tenuiflora* (Willd. Poir.) em solos de diferentes habitats de campos rupestres. Foram identificadas bactérias pertencentes ao filo  $\alpha$  e  $\beta$  proteobactéria, com predomínio dos gêneros *Rhizobium* e *Burkholderia*, respectivamente, tendo maior diversidade nos habitats cerrado e brejo turfoso, seguidos de campo pedregoso, afloramentos rochosos e brejos arenosos (CARVALHO, 2010).

Em relação ao processo de mineração, estudos relacionados com a tolerância de rizóbios a metais pesados têm sido realizados para diferentes gêneros (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; BROSS et al., 2004; CARRASCO et al., 2005). Melloni et al.

(2006) utilizaram plantas iscas para o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL) em solos minerados e demonstraram a presença de uma grande diversidade dessas bactérias na área estudada. A maior diversidade de BFNNL pode favorecer a simbiose com várias espécies de leguminosas, maximizar a fixação biológica do nitrogênio em áreas degradadas e aumentar o poder de resiliência dos processos microbianos do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

### **2.2.1 *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb**

O *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb, comumente chamado de siratro, é originário do México e de ocorrência natural em alguns países da América Central e do Sul (HUTTON, 1962). Esta espécie vegetal é uma leguminosa tropical perene com raízes profundas, trepadeira herbácea, cuja floração e sementes ocorrem, principalmente, em outubro, como resposta ao comprimento de dias curtos (ECOCROP, 2012). Os caules são peludos, com diâmetro máximo de 5 mm e podem chegar a 5 m de comprimento; as folhas são pinadas trifoliata, verde-escuras e peludas na face inferior; os frutos são vagens lineares com 5 a 10 cm de comprimento, contendo sementes oblongas, ovoides e coloração do marrom-claro ao preto (JONES; MANNETJE, 1992). Segundo o mesmo autor, o siratro é uma das principais leguminosas forrageiras tropicais, persistente sob o intenso estresse de pastagem, tolerante à seca, adaptado a uma variedade de tipos de solo, mas apresenta baixa tolerância a condições de alagamento e geada, tendo temperatura ótima para crescimento entre 26 a 30 °C, podendo seu crescimento ser reduzido em temperatura abaixo de 21 °C.

Em 1960 ocorreu o início da expansão das plantações de siratro no México, no Brasil e em outros países, estando entre as mais versáteis leguminosas forrageiras cultivadas nas regiões neotropicais, sendo de fácil

estabelecimento, resistente a doenças e de boa convivência com as gramíneas (HUTTON, 1962).

O cultivo de plantas fixadoras de nitrogênio nativas ou adaptadas de outras regiões, em rotação ou consorciadas com culturas de importância econômica, é de grande interesse das propriedades rurais, por proporcionar o aumento, a disponibilidade e a reciclagem de nutrientes, além de reduzir os efeitos de estresses abióticos, proteger o solo contra erosão e melhorar a infiltração de água dos sistemas produtivos (WUTKE et al., 2009; GUERRA et al., 2002).

Espíndola et al. (2006) observaram o efeito benéfico das leguminosas puerária e siratro no desenvolvimento vegetativo da bananeira, quando cultivadas em consórcio com a mesma. Segundo os mesmos autores, as leguminosas estudadas podem proporcionar vários benefícios ao sistema de cultivo, em virtude da rápida decomposição de resíduos, do expressivo aporte de nutrientes, o que gera economia no uso de fertilizantes minerais e contribui para o manejo ecológico, assegurando maior sustentabilidade ao agroecossistema.

Collier et al. (2012) verificaram que, após 30 dias da semeadura, o siratro obteve valores expressivos com relação à supressão de plantas invasoras, apresentando um desenvolvimento inicial mais rápido, sendo mais eficiente na competição por luz e água, o que pode ter dificultado o estabelecimento das plantas invasoras.

O siratro é capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e não necessita de adubação nitrogenada; responde positivamente a P e K em solos arenosos, tolera uma ampla faixa de pH do solo (4,5 a 8), é uma das leguminosas tropicais mais tolerantes a Al, Mn e NaCl e, quando nodulada por bactérias fixadoras de nitrogênio, pode fixar 55 a 175 kg de N/ha/ano (COOK et al., 2005).

A espécie vegetal *M. atropurpureum* é considerada uma hospedeira promíscua, por ser capaz de estabelecer simbiose com diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas, tais como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (BROMFIELD; BARRAN, 1990; TRINICK; MILLER; HADOBAS, 1991), *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (FLORENTINO et al., 2009; GONÇALVES; MOREIRA, 2004; MOREIRA et al., 2006), e as bactérias da subclasse  $\beta$ -proteobactéria, *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; SILVA, 2009; CARVALHO, 2010) e *Cupriavidus* (FLORENTINO et al., 2009; SILVA et al., 2012).

O siratro é utilizado para testar a nodulação e a eficiência simbiótica de fixação de nitrogênio por um grande número de estirpes  $\alpha$ -proteobactérias. Entretanto, Moulin et al. (2001) utilizaram o siratro como planta modelo para demonstrar que a estirpe *Burkholderia tuberum* STM678<sup>T</sup> pode nodular leguminosas e constataram que a mesma contém os genes de nodulação *nodA* e duas cópias do gene *nodC* e, ao longo de um período de três semanas, a estirpe em estudo formou de 5 a 20 nódulos por planta sobre as raízes de *M. atropurpureum*.

Angus et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de verificar se a temperatura e outros fatores ambientais influenciam a eficiência na fixação do nitrogênio da estirpe *Burkholderia tuberum* STM678<sup>T</sup>, utilizando o siratro como planta modelo. Os autores observaram que a nodulação efetiva do siratro por *Burkholderia tuberum* STM678<sup>T</sup> ocorre esporadicamente a 21/22 °C e que vários mecanismos, tais como síntese de trealose, acúmulo de prolina, bem como a produção de exopolissacarídeos, podem conferir à bactéria tolerância à variação de temperatura e dessecação.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), dentre as bactérias estudadas que fixam nitrogênio, as espécies *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1879; FRANK, 1889) biovares *phaseoli*, *trifolii*, *viciae* (JORDAN, 1984); *Rhizobium*

*giardini* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997) biovares *phaseoli*, *giardinit*; *Rhizobium gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997); *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1984); *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa et al., 2005) e *Azorhizobium loti* (Jarvis; Bpankhurst; Patel, 1982; Jarvis et al., 1997; Jordan, 1984), com as suas respectivas estirpes tipo, ATCC10004<sup>T</sup>, H152<sup>T</sup>, R602sp<sup>T</sup>, ATCC10324<sup>T</sup>, BTA-1<sup>T</sup>, NZP2213<sup>T</sup>, são espécies conhecidas de rizóbios que estabelecem simbiose com *M. atropurpureum*.

### **2.2.2 *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze**

*Mimosa bimucronata* (DC) Kuntze, também chamada, popularmente, de maricá, pertence à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), ordem Fabales, família Leguminosae e à subfamília Mimosoideae. Ocorre de forma natural no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no extremo noroeste do Uruguai (LORENZI, 2002). Segundo o mesmo autor, no Brasil, esta espécie é encontrada nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em ambientes de floresta estacional decidual, floresta ombrófila densa, na formação de baixo-montanha, na planície quaternária, nas várzeas e nas beiras de regatos sujeitos a inundações periódicas ou locais úmidos, restinga e caatinga.

*M. bimucronata* é uma planta perene, arbórea, medindo de 4 a 8 m de altura, altamente ramificada e espinhosa, cuja reprodução é realizada por sementes (LORENZI, 2000). Esta espécie vegetal é adaptada a solos arenosos encharcados e mal drenados, com pH variando entre 4,0 e 5,0. Entretanto, em plantios experimentais, tem obtido melhor crescimento em solos bem drenados, com textura argilosa e a areno-argilosa, com alta fertilidade e propriedades

físicas adequadas para uma espécie pioneira na sucessão florestal e de fácil reflorestamento, e, portanto, apresenta importante função ecológica (REITZ; KLEIN, R; REIS, 1988; MARCHIORI, 1993).

As plantas de espécies pioneiras apresentam sementes que germinam apenas sob condição de alta temperatura e luminosidade, têm o hábito de crescimento mais rápido do que as não pioneiras, as quais apresentam habilidade de germinar e sobreviver na sombra e na presença de clareiras pequenas, e têm o crescimento otimizado pelo ambiente parcialmente sombreado (KAGEYAMA; CASTRO, 1989). Assim, Bitencourt et al. (2007) verificaram que a *M. bimucronata* é uma ótima espécie pioneira para o processo de recuperação de áreas impactadas pela atividade de mineração e pastejo, além de fornecer abrigo para fauna e proteger as plântulas de diversas espécies do pisoteio de bovinos.

No contexto da importância florestal, a espécie *M. bimucronata* pode ser recomendada para a composição de reflorestamentos heterogêneos em áreas degradadas ou perturbadas, bem como para o controle de processos erosivos e o para plantio de terrenos sujeitos à inundação periódica, uma vez que apresenta uma boa adaptação a terrenos úmidos e rochosos (LORENZI, 2002).

Outro aspecto relevante para a atuação da *M. bimucronata* no processo de recomposição florística de uma determinada área é tratar-se de uma espécie vegetal capaz de estabelecer relações simbióticas com micro-organismos, tais como as bactérias fixadoras de nitrogênio (SPRENT, 2001) e os fungos micorrízicos (PATREZE; CORDEIRO, 2004).

Patreze e Cordeiro (2004), ao realizarem estudos relacionados à resposta da adubação mineral e da inoculação com rizóbios e micorrizas nas espécies *Anadenanthera colubrina*, *Mimosa bimucronata* e *Parapiptadenia rigida*, em condições de viveiro, constataram que o estabelecimento da simbiose destes micro-organismos pode favorecer o crescimento e, conseqüentemente, o sucesso

pós-plantio dessas espécies florestais. Segundo os mesmos autores, a falta de fertilizantes nitrogenados nas mudas de *M. bimucronata* foi corrigida pela fixação biológica de nitrogênio e, embora tenha ocorrido a nodulação espontânea em *A. colubrina* e *M. bimucronata*, a inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio aumentou o número de nódulos, a atividade da nitrogenase e o conteúdo da leg-hemoglobina das mesmas.

Pesquisas realizadas por Faria et al. (1997) retratam a existência de estirpes (BR 3461, BR 3460) eficientes na fixação biológica do nitrogênio em *M. bimucronata*. Entretanto, são necessários novos estudos com outras estirpes, as quais possam contribuir para o ciclo do nitrogênio, garantir a resiliência dos processos biológicos e a manutenção de ecossistemas frágeis, como o campo rupestre.

### **2.2.3 *Mimosa foliolosa* Benth. subsp . *pachycarpa* (Benth.)**

*Mimosa foliolosa* Benth. subsp. *pachycarpa* (Benth.) Barneby var. *pachycarpa* pertence à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), ordem Fabales, família Leguminosae e subfamília é Mimosoideae. É uma espécie endêmica e de ocorrência em solos arenosos ou pedregosos associados com afloramentos de quartzito, a 980 e 1.300 m de altitude, na Chapada Diamantina, sudeste do Brasil (BARNEBY, 1985), local conhecido por seus altos níveis de endemismo e biodiversidade (GIULIETTI; PIRANI; HARLEY, 1997).

Em relação às características taxonômicas, a espécie *M. foliolosa* é descrita como um arbusto ou subarbusto cujo caule contém cera ou resina e pode apresentar glândulas, ramos com indumento piloso, folhas filiformes, multijugas, cinéreas e infrutescência cor rufa axilar. Inflorescências são globosas e os botões florais estão em capítulos com bráctea; as frutas têm 24-46 mm de

comprimento por 7-14 mm de largura e as sementes, 4-6 por 3-4 mm, obovadas ou orbiculares (BARNEBY, 1991).

O fluxo de floração e frutificação é variável ao longo do ano, mas, em relação à área onde é encontrada a espécie, ou seja, na Serra do Cipó, no Brasil, com precipitação média anual de 1.300 mm e temperatura média entre 17,4-19,8 °C, as plantas florescem no período de dezembro a março, e a frutificação ocorre entre agosto e setembro (MADEIRA; FERNANDES, 1999). Partes da planta ou de órgãos são, muitas vezes, utilizadas por insetos, como as abelhas, para agregação ou como repouso (LINSLEY, 1962).

Esta espécie é altamente adaptada a ambientes hostis, com baixa fertilidade do solo e escassez de água, bem como em local impactado por ações antrópicas (WHELAN, 1995, RIBEIRO; FERNANDES, 2000, NEGREIROS et al., 2011). Essas características fazem da *M. foliolosa* uma candidata ideal para o uso em programas de restauração ambiental.

Neste contexto, segundo Silveira, Fernandes e Fernandes (2005), Silveira e Fernandes, (2006), Negreiros et al. (2009), a capacidade de espécies arbóreas e arbustivas, tais como a *M. foliolosa*, de resistir ao estresse nutricional, mediante o crescimento da mesma em determinadas condições extremamente adversas, evidencia o seu potencial para o restabelecimento florestal, em programas de revegetação em áreas degradadas derivadas de quartzito.

De acordo com Silveira e Fernandes, (2006), Negreiros et al. (2009), o sucesso do emprego de *M. foliolosa* para a ecologia de restauração de áreas é maximizado devido à alta produção de suas sementes e à capacidade de germinação e de estabelecimento.

Assim, a utilização de mudas de espécies nativas e endêmicas, como a de *M. foliolosa*, pode ser uma alternativa para o processo de recuperação dessas áreas, cuja tolerância ao estresse nutricional e hídrico e variações de temperatura

e luminosidade do meio pode ser um fator limitante e primordial para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, e o restabelecimento da comunidade vegetal (TEMPERTON et al., 2007).

Entretanto, ainda não existem estudos da simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio que apresentem eficiência na fixação biológica do nitrogênio em *M. foliolosa*. Dessa forma, pesquisas relacionadas à importância da interação entre leguminosas arbóreas, nativas, edêmicas, tal como *M. foliolosa*, e bactérias eficientes em fixar nitrogênio mineral são necessárias para o emprego das mesmas na reabilitação e na restauração de ecossistemas naturais em larga escala (THRALL et al., 2005).

### **2.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio**

O nitrogênio é um macronutriente que compõe, aproximadamente, 78% do ar atmosférico, se encontra na forma gasosa e indisponível para a maioria dos organismos, e apenas uma parcela relativamente pequena das espécies de procaríotos tem a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o  $N_2$  para  $NH_3$ , forma inorgânica combinada, que pode, então, tornar-se disponível para as plantas e outros organismos, os quais são chamados de bactérias fixadores de  $N_2$ , ou diazotróficos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo os mesmos autores, dentre as fixadoras de nitrogênio, podem-se encontrar aquelas que são de vida livre, as associativas e as que estabelecem simbiose com as leguminosas. Estas últimas são capazes de formar estruturas especializadas denominadas de nódulos e são conhecidas como bactérias nodulíferas de leguminosas (BNL).

O estabelecimento da relação simbiótica entre as espécies de bactérias e espécies de plantas pode variar, podendo ser altamente específica, quando as bactérias são capazes de formar simbiose com um pequeno número de espécies de plantas ou promíscua, quando elas são capazes de estabelecer simbiose com

um grande número de espécies de leguminosas (MOREIRA, 2008). Para o estabelecimento da simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) em leguminosas é necessária a ocorrência de troca de sinais moleculares entre a planta e a BFN, em que a primeira libera flavonoides que são reconhecidos pela proteína *nodD* da bactéria, desencadeando a transcrição de genes da nodulação *nodABC* e a síntese dos fatores Nod. A planta reconhece estes fatores Nod e inicia-se o encurvamento do pelo radicular e, posteriormente, a formação dos nódulos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entre os micro-organismos encontrados na rizosfera das plantas, as BFN que nodulam leguminosas são tidas como componentes essenciais na sustentabilidade do sistema solo e planta (SMITH; READ, 2008). A BFN reduz o custo de produção de leguminosas, pois os fertilizantes químicos têm alto preço e podem ser lixiviados e contaminar o solo e os recursos hídricos, sendo a inoculação de BFN uma alternativa viável que não causa danos ao meio ambiente (GRAHAM; VANCE, 2003).

Os micro-organismos diazotróficos endofíticos podem desempenhar importante papel na reabilitação e na sustentabilidade dos ecossistemas, uma vez que incorporam N por meio da fixação biológica em quantidades que podem variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N (BAZZICALUPO; OKON, 2000). Segundo Dobereiner (1984), para determinadas espécies de leguminosas, como *Mimosa caesalpiniaefolia*, *Prosopis juliflora* e *Leucaena elucocaephala*, já existem inoculantes disponíveis e as leguminosas arbóreas bem estabelecidas podem fixar até 600 kg de N/ha por ano, demonstrando a importância da utilização dessas espécies em estudos de reflorestamento.

A fixação biológica de nitrogênio é mediada por uma parcela dos procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Eles podem ser encontrados entre os aeróbios, os anaeróbios e os anaeróbios facultativos e em vários grupos

filogenéticos representativos de Bactéria e de Archaea. A alta diversidade desses organismos garante não só a resiliência do importante processo que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes tipos de hábitat terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em estudos de diversidade de bactérias que nodulam leguminosas têm sido utilizadas “plantas iscas”, de forma a capturar populações de BFN de amostras de solo, assim como coletar nódulos diretamente das raízes das plantas (MOREIRA, 2008). Segundo o mesmo autor, este último método permite demonstrar a relação da diversidade de BFN com a diversidade de suas espécies hospedeiras, além dos fatores ambientais, os quais afetam a expressão dos genótipos dos simbiontes (MOREIRA, 2008).

A junção das diferentes técnicas moleculares e tradicionais tem permitido caracterizar e identificar diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, tais como *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Allorhizobium* (LAJUDIE et al., 1998), *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Cupriavidus* (CHEN et al., 2001), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Blastobacter* (BERKUM; EARDLY, 2002) e *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005).

Em estudos realizados por Jaramillo (2010), depois de formar os grupos mediante a técnica de BOX-PCR, foram escolhidos 20 isolados bacterianos para sequenciar, obtendo-se sequências parciais da região do *primer* 3'- 5' que codifica o 16S rDNA, sendo analisadas filogeneticamente. Essas sequências variaram de 416 a 850 pb e foram submetidas ao banco de dados GenBank, mostrando uma porcentagem de identidade de 97% a 100% com os isolados já estudados.

Guimarães et al. (2012), ao estudarem a diversidade genética e a eficiência simbiótica de 119 estirpes isoladas de solos agrícolas na Amazônia Ocidental utilizando caupi como planta armadilha, obtiveram 50 genótipos com similaridade de 70% e 21 genótipos de similaridade de 30%, por meio da técnica de agrupamento BOX-PCR. O sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes representantes do BOX-PCR mostrou predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, com alta diversidade de espécies, além da identificação de espécies de *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Achromobacter*.

As espécies de leguminosas que são capazes de formar simbiose com rizóbios têm sido utilizadas para a restauração da fertilidade do solo em áreas degradadas (FRANCO; FARIA, 1997; CARNEIRO et al., 1999; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; SILVA; SOARES; SIQUEIRA, 2006; FERREIRA et al., 2012). O solo de áreas degradadas colonizadas por leguminosas capazes de se associarem com rizóbios apresenta maior diversidade e biomassa, em relação àqueles que não têm espécies vegetais que formam associações com rizóbios (CAMPELO, 1998).

#### **2.4 O gênero *Burkholderia* e sua relação simbiótica com as leguminosas *Mimosa* spp.**

O gênero *Burkholderia* foi proposto por Yabuuchi et al. (1992), ao avaliarem as características fenotípicas e a composição celular com o sequenciamento da região 16S rDNA, na homologia do DNA-DNA. Segundo os mesmos, este gênero surgiu a partir de estudos com a *Burkholderia cepacia*, anteriormente chamada de *Pseudomonas cepacia*, a qual foi especificada como espécie padrão do grupo II, em homologia ao rRNA de *Pseudomonas*.

A *Burkholderia cepacia* foi descrita por Burkholder (1950) e inicialmente identificada como a espécie fitopatogênica responsável pelo

apodrecimento dos bulbos de cebolas. Em estudos moleculares foi demonstrado que diversos isolados, classificados como uma única espécie, na verdade apresentavam diferenças genotípicas, apesar da grande semelhança fenotípica (VANDAMME et al., 1997). Assim, criou-se a expressão “complexo de *Burkholderia cepacia*” para agrupar essas espécies filogeneticamente associadas (COENY; VANDAMME, 2003).

Atualmente, o gênero *Burkholderia* tem 70 espécies amplamente distribuídas em vários ambientes naturais, ocorrendo no solo, na água, em associação com plantas, fungos, animais e humanos (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2013; WONG-VILLARREAL; CABALLERO-MELLADO, 2010).

De acordo com os mesmos autores, o gênero *Burkholderia* está em constante crescimento, no que diz respeito ao número de espécies. Entretanto, a taxonomia deste gênero está sendo modificada de tal maneira que novos componentes estão sendo frequentemente propostos, de forma que novos estudos são necessários para a melhor caracterização do mesmo.

As linhagens do gênero *Burkholderia* são subdivididas pelos membros do complexo *B. cepacia*, os patogênicos aos humanos e animais, e os pertencentes ao grupo *B. pseudomallei*, as espécies fitopatogênicas e algumas espécies saprofíticas e associadas às plantas, incluindo aquelas que nodulam leguminosas e promovem crescimento vegetal (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2013).

A fixação biológica de nitrogênio realizada por *Burkholderia* spp. foi descoberta quando a *B. vietnamiensis* foi descrita por Gillis et al. (1995). Posteriormente, essa capacidade foi detectada em outras espécies descritas, como *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), *B. tropica* (REIS et al., 2004), *B. xenovorans* (GORIS et al., 2004), *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006), *B. kururiensis* e em mais 12 espécies capazes de formar nódulos efetivos em leguminosas, tais como *B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis*, *B.*

*mimosarum*, *B. nodosa*, *B. sabiae*, *B. diazotrophica*, *B. symbiotica*, *B. phenoliruptrix*, *B. sprentiae*, *B. rhynchosiae* e *B. caballeronis* (VANDAMME et al., 2002; CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2006; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008; OLIVEIRA-CUNHA et al., 2012; MEYER et al., 2013a, MEYER et al., 2013b; MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2013), além de *B. fungorum*, que também é capaz de nodular leguminosas, embora seja ineficaz (FERREIRA et al., 2012).

Tem sido constatada a capacidade das espécies de *Burkholderia* em formar nódulos em *Macroptilium atropurpureum* (MOULIN et al., 2001; ELLIOT et al., 2007; ANGUS et al., 2013), em espécies de *Cyclopia* (ELLIOT et al., 2007) e em *Phaseolus vulgaris* (TALBI et al., 2010). Entretanto, diversos autores têm observado a afinidade de leguminosas da subfamília Mimosoideae por bactérias nodulíferas do gênero *Burkholderia*, como foi relatado por Barrett e Parker (2005), ao verificarem a predominância de estirpes de *Burkholderia* em nódulos radiculares em plantas da subfamília Mimosoideae (*Mimosa pigra*, *M. casta*, *M. pudica*, *Abarema macradenia* e *Pithecellobium hymenaeafolium*) na ilha de Barro Colorado, no Panamá, e por Chen et al. (2005), ao isolar vinte estirpes pertencentes ao gênero *Burkholderia* de leguminosas da subfamília Mimosoideae provenientes do Brasil e da Venezuela.

Em pesquisas anteriores já houve relatos da afinidade simbiótica de *Burkholderia* spp. com as leguminosas do gênero de *Mimosa*. Por exemplo, em estudos realizados por Chen et al. (2003), a maioria das 190 bactérias obtidas a partir de nódulos de *M. pudica* e *M. diplotricha*, em Taiwan, pertencia ao grupo  $\beta$ -proteobactéria e duas estirpes isoladas de nódulos de *Mimosa diplotricha* e *Mimosa pudica*, também em Taiwan, foram descritas como *B. caribensis* (VANDAMME et al., 2002)

Em estudos posteriores, Chen et al. (2006) obtiveram quatorze isolados, identificados como *B. mimosarum*, a partir de nódulos de *Mimosa pigra* e

*Mimosa scabrella*, oriundos da Venezuela, do Brasil e de Taiwan. Em seguida, uma nova espécie de *Burkholderia*, capaz de nodular e fixar nitrogênio, obtida a partir de nódulos de *M. scabrella* e *M. bimucronata* nativas do Brasil, foi descrita e nomeada como *B. nodosa* (CHEN et al., 2007).

Duas estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *M. caesalpinifolia*, no Brasil, foram descritas como nodulíferas e identificadas como *B. sabiae* (CHEN et al., 2008). Em um extenso levantamento de nodulação em *Mimosa* spp., realizada em dois grandes biomas do Brasil, cerrado e caatinga, verificou-se que estirpes de *Burkholderia* são os simbiontes predominantes nestes dois centros de diversidade, sendo capazes de nodular espécies de mimosas raras, endêmicas e ameaçadas de extinção, tais como *M. splendida*, *M. setosissima*, *M. decorticans*, *M. calodendron*, *M. campicola*, *M. dominarum*, *M. gatesiae*, *M. irrigua*, *M. pseudosepiaria*, *M. pyreneae*, *M. regina*, *M. setuligera*, *M. skinneri*, *M. speciosissima*, *M. ulbrichiana*, *M. verecunda*, *M. callithrix* e *M. cordistipula*, portanto, contribuindo para o ciclo do nitrogênio e a manutenção de ecossistemas frágeis do cerrado e da caatinga (REIS et al., 2010).

Em estudos com 148 estirpes isoladas de nódulos de 47 espécies de *Mimosa* oriundas da América do Sul, verificou-se que estirpes de *Burkholderia* foram capazes de estabelecer simbiose com essas espécies de plantas (BONTEMPS et al., 2010; REIS et al., 2010).

Mishra et al. (2011), ao avaliarem a diversidade genética de 221 bactérias simbiontes de *Mimosa pudica* em oito tipos de solos de diversos ambientes da Guiana Francesa, encontraram uma grande diversidade de beta-rizóbio, como *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia tuberum*, mas também foram encontradas *Burkholderia mimosarum*, *Burkholderia* spp. e, pela primeira vez na América do Sul, *Cupriavidus taiwanensis*.

Em outros estudos há relatos da atuação de bactérias do gênero *Burkholderia* no crescimento vegetal, principalmente pela produção de

fitorreguladores e fixação biológica de nitrogênio. Angus et al. (2013) observaram, em sua análise experimental, que as estirpes *B. tuberum* STM678, *B. unamae* MTI-641, *B. silvatlantica* SRMrh20 e *B. silvatlantica* PVA5 apresentaram atividade solubilizadora de fosfato inorgânico e secreção de sideróforos.

Em pesquisas realizadas por Silva et al. (2012), com 48 isolados obtidos de solos da região da Amazônia no Brasil, foi demonstrada uma diversidade cultural e bioquímica do gênero *Burkholderia*, tendo 44 estirpes sido identificadas como *B. fungorum*, um isolado bacteriano como *B. caribensis* e *B. lata*, e duas estirpes como *B. contaminans*. Destes, 96% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, 97% apresentaram capacidade de fixação do N<sub>2</sub> livre e um isolado apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, podendo estes ser empregados na promoção do crescimento de plantas e apresentar potencial de aplicação no controle biológico de fitopatógenos.

A solubilização de fosfato inorgânico tem sido relacionada com a produção de compostos de ácidos orgânicos, como foi constatado por Lin et al. (2006), ao verificarem que a produção de ácido glucônico pela *B. cepacia* foi a principal responsável pela solubilização de trifosfato de cálcio. Outra forma de atuação da *Burkholderia* na promoção do crescimento vegetal é a manutenção dos níveis de etileno baixos nas plantas, por meio da ação da enzima ACC deaminase, como foi verificado em estudos realizados por Pandey, Kang e Maheshwari (2005), em *Mimosa pudica* e, posteriormente, em pesquisas com *B. xenovorans*, *B. unamae* e *B. phytofirmans* (CABALLERO-MELLADO et al., 2007).

Pesquisas relacionadas à obtenção de uma melhor caracterização genética de espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* e da sua relação e eficiência simbiótica com as leguminosas são necessárias, visto a importância para os estudos taxonômicos, fisiológicos, ecológicos e aplicação econômica,

uma vez que as mesmas podem atuar no processo de fixação biológica de nitrogênio, associadas a espécies de leguminosas de grande importância florestal e, assim, garantir a sustentabilidade dos ecossistemas.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. J. V.; CARDIN, L.; KROPP, M. S. Angiosperm disjunction “Campos Rupestres-Restingas”: a reevaluation. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 675–685, July/Sept. 2007.

ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 207, n. 1, p. 67–79, Mar. 2010.

ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Summit vascular flora of the Serra de São José, Minas Gerais, Brazil. **Check List**, Darien, v. 5, n. 1, p. 35–73. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.? vol=5&num=1>. Acesso em: 22 dez. 2014.

ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Plant species in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. **Vegetation**, v. 113, p. 125–139, 1994.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardini* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, n. 4, p. 996–1006, Oct. 1997.

ANGUS, A. A. et al. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant and Soil**, The Hague, v. 369, n. 1-2, p. 543-562, Aug. 2013.

BARNEBY, R. C. **Sensitivae censitae**. Bronx: New York Botanical Garden, 1991.

BARNEBY, R. C. The genus *Mimosa* (mimosaceae) in Bahia, Brazil: new taxa and nomenclatural adjustments. **New York Botanical Garden**, Bronx, v. 319, n. 1-2, p. 125-153, June 1985.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *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.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 1, p. 57–65, Jan. 2005.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F. et al. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 409-410.

BERGER, F.; REY, F. Mountain protection forests against natural hazards and risks: new French developments by integrating forests in risk zoning. **Natural Hazards**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 395–404, Nov. 2004.

BERKUM, P. B.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied Environmental Microbiology**, Oxford, v. 68, p. 1132-1136, Mar. 2002.

BITENCOURT, F. et al. Nucleação de *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze em áreas degradadas pela mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 750-752, jul. 2007.

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

BRADSHAW, A. D. Restoration of mined lands: using natural processes. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 255–269, Aug. 1997.

BRADSHAW, A. D. The reconstruction of ecosystems: presi-dential address to the british ecological society. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 20, p. 1–17, 1983.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 5, p. 369-372, 1990.

BROOS, K. et al. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 4, p. 633-640, Apr. 2004.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, n. 1, p. 115-117, 1950.

BURMAN, A. Saving brazil's savannas. **NewScientist**, New York, n. 1758, p. 30-34, Mar. 1991.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 4, p. 1165–1172, July 2004.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5308–5319, Aug. 2007.

CAIAFA, A. N.; SILVA, A. F. da. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 87, p. 163–173, 2005.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1998. p. 183-1966.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1669-1677, set. 1999.

CARRASCO, J. et al. Isolation and characterization of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Azanalcollar pyrite mine. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 6, p. 1131-1140, 2005.

CARVALHO, F. de et al. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupesrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 9–19, Jan. 2012.

CARVALHO, F. de. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbioses radiculares em campos rupestres da serra do cipó, MG**. 2010. 87 p. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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

CHEN, W. M. et al. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, Sept. 2008.

CHEN, W. M. et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, Dec. 2003.

CHEN, W. M. et al. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, Nov. 2005.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 392-397, Oct. 1988.

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

COENYE, T. et al. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 623-627, 2004.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, n. 9, p. 719-729, Sept. 2003.

COLLIER, L. S. et al. Desenvolvimento de leguminosas herbáceas perenes, semeadas na época das águas no sul do Tocantins. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 61-71, 2012.

- CONCEICÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 29, p. 37–48, 2002.
- CONCEICÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina: substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 85–111, 2005.
- COOK, B. G. et al. Tropical forages. **Macroptilium Atropurpureum**, Australia, 2005. Disponível em: <[http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Macroptilium\\_atropurpureum.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Macroptilium_atropurpureum.htm)>. Acesso em: 14 set. 2013.
- DAVIS, B. N. K. et al. Early seral communities in a limestone quarry: an experimental study of treatment effects on cover and richness of vegetation. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 473–490, Aug. 1985.
- DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, p. 83-90, jun. 1984.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of Azorhizobium caulnodans gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania rostrata. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.
- ECOCROP. New York: FAO, 2012. Disponível em: <<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/home>>. Acesso em: 15 out. 2013.
- ELLIOTT, G. N. et al. Nodulation of Cyclopia spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 7, p. 1403-1411, Dec. 2007.
- ESPINDOLA, J. et al. Banana plants intercropped with perennial herbaceous legumes used as living mulches. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 415–420, mar. 2006.

FARIA, S. M. et al. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais. **Recomendação Técnica**, Seropédica, n. 134, p. 1-4, 1997.

FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 1947–1959, May 2012.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbiont of other species. **Scentia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. de. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5-6, p. 897-903, May/June 1997.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C. Importância das leguminosas arbóreas nativas recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. In: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003.

FRANK, B. Ueber die parasiten in den Wurzelan-schwillungen der Papilionaceen. **Botanical Zeitung**, Berlin, v. 37, p. 376-399, 1879.

FRANK, B. **Ueber dies pilzsymbiose der leguminosen**: volume 7. Stuttgart: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1889.

FUNCH, R. R.; HARLEY, R. M. Reconfiguring the boundaries of the chapada diamantina national park (brazil) using ecological criteria in the context of human-dominated landscape. **Landscape and Urban Planning**, Amsterdam, v. 83, n. 4, p. 355-362, 2007.

GIBSON, D. J. **Grasses and grassland ecology**. Oxford: Oxford University Press, 2009.

GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N,-fixing isolates from Rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 45, p. 274-289, 1995.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: VANZOLINI P. E; HEYER, W. R. (Ed.). **Proceedings of a workshop on neotropical dis-tribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasil Ciência, 1988. p. 39–69.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R. M. Espinhaço Range region, Eastern Brazil. In: DAVIS, S. D. et al. (Ed.). **Centres of plant diversity: volume 3**. Oxford: Information Press, 1997. p. 397-404.

GOMES, V. R. G. et al. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. **Conservation Genetics**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 157-165, 2004.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its nodule isolates *Azorhizobium jonhannae* with other Legume Host and Rhizobia. **Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GORIS, J. et al. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1677–1681, Sept. 2004.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater utilization. **Plant Physiology**, Washington, v. 131, n. 3, p. 872-877, Mar. 2003.

GUERRA, J. G. M. et al. Managing carbon and nitrogen in tropical organic farming through green manuring. In: BADEJO, M. A.; TOGUN, A. O. (Ed.). **Strategies and tactics of sustainable agriculture in the tropics: volume 2**. Ibadan: College Press, 2002. p. 125-140.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria Isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, Sept. 2012.

HARLEY, R. M. Introduction. In: STANNARD, B. L.; HARVEY, Y. B.; HARLEY, R. M. (Ed.). **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Kew: Royal Bot Gard, 1995. p. 1-151.

HUTTON, E. M. Siratro: a tropical pasture legume bred from *Phaseolus atropurpureus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourne, v. 2, p. 117-25, 1962.

JARAMILLO, P. M. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob Agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca**. 2010. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 895-898, 1997.

JARVIS, B. D. W.; BPANKHURST, C. E.; PATEL, J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 32, n. 3, p. 378-380, July 1982.

JONES, R. M.; MANNETJE, L. T. *Macroptilium atropurpureum* (DC.) urban. In: MANNETJE, L. T.; JONES, R. M. (Ed.). **Record from proseabase**. Indonesia: Prosea, 1992. p. 1-133.

JORDAN, D. C. *Bradyrhizobium*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 242-244.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. **IPEF**, Piracicaba, n. 41-42, p. 83-93, jan./dez. 1989.

LABES, G.; ULRICH, A.; LENTZSCH, P. Influence of bovine slurry deposition on the structure of nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv vicia soil populations in a natural habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1717-1722, May 1996.

LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 4, p. 1272-1290, Oct. 1998.

LE STRADIC, S. et al. The role of native woody species in the restoration of Campo Rupestres in quarries Soizig. **Applied Vegetation Science**, London, v. 17, n. 1, p. 109-120, Jan. 2013.

LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1-2, p. 127-145, June 2009.

LIN, T. F. et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, Barking, v. 97, n. 7, p. 957-960, May 2006.

LINSLEY, E. G. Sleeping aggregations of aculeate Hymenoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 55, p. 148–164, 1962.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil: volume: 1. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

MADEIRA, J. A.; FERNANDES, G. W. Reproductive phenology of sympatric Chamaecrista taxa of Chamaecrista (Leguminosae) in Serra do Cipó, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 463–479, July 1999.

MARCHIORI, J. N. C. Wood and bark anatomy of *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze. **Ciências Florestais**, Santa Maria, v. 3, n. 1, p. 85-106, 1993.

MARDRZAK, C. J. et al. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1194-1200, Apr. 1995.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L. et al. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, n. 6, p.1063–1071, Dec. 2013.

MATOS, E. D. et al. Green manure in coffee systems in the region of zona da mata, Minas Gerais: characteristics and kinetics of carbon and nitrogen mineralization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 2027-2035, set./out. 2008.

MATOS, E. S. et al. Decomposition and nutrient release of Leguminous plants in coffee Agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 141-149, jan./fev. 2011.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 343-355, Mar. 2002.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) em solos e mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, mar./abr. 2006.

MEYER, S. E. de et al. *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov. isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules from South Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 11, p. 3944-3949, Nov. 2013b.

MEYER, S. E. de et al. *Burkholderia sprentiae* sp. nov. isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules from South Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 11, p. 3950-3957, Nov. 2013a.

MISHRA, R. P. N. et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 2, p. 487-503, Feb. 2011.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Editora da UFLA, 2008. p. 621-666.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinerare* sp. Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz). Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 2006.

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

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6840, p. 948-950, June 2001.

NEGREIROS, D. et al. Caracterização físico-química de solos quartzíticos degrada-dos e áreas adjacentes de campo rupestre na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6, n. 3, p. 156 –161, set./dez. 2011.

NEGREIROS, D. et al. Seedling growth and biomass allocation of endemic and threatened shrubs of rupestrian fields. **Acta Oecologica**, Paris, v. 35, p. 301-310, 2009.

OLIVEIRA-CUNHA, C. de et al. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbi-ont of *Mimosa flocculosa*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 194, n. 23, p. 18812-18821, Dec. 2012.

OSBORNE, L. L.; KOVACIC, D. A. Riparian vegetated buffer strips in water-quality restoration and stream management. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 243–258, Apr. 1993.

PANDEY, P.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. C. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 1-10, July 2005.

PARKER, M. A.; WURTZ, A. K.; PAYNTER, Q. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: a comparative analysis. **Biological Invasions**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 127–138, Mar. 2007.

PATREZE, C. M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 196, n. 1-2, p. 275–285, July 2004.

PEREIRA, A. C.; BORBA, E. L.; GIULIETTI, A. M. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* giul. (eriocaulaceae) from the chapada diamantine. Brazil: implications for conservation and taxonomy. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 153, n. 4, p. 401-416, Apr. 2007.

PERIN, L. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, Aug. 2006.

QUEIROZ, L. P.; SENA, T. S. N.; COSTA, M. J. S. L. Flora vascular da Serra da Jiboia, Santa Terezinha – Bahia. I: o campo rupestre. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 15, p. 27-40, 1996.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 12, p. 1-2, dez. 2008.

REIS, F. B. J. dos et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, London, v. 186, n. 4, p. 934-946, June 2010.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, Nov. 2004.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Corag, 1988.

RIBEIRO, K.T.; FERNANDES, G. W. Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 147, n. 2, p. 205 -218, 2000.

RIBEIRO, P. L. et al. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 270, n. 1-2, p. 97-101, Jan. 2007.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Nov. 2002.

SESSITSCH, A. et al. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 3, p. 1187-1192, May 2005.

SHEU, S. Y. et al. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 2, p. 435-441, Feb. 2013.

SHEU, S. Y. et al. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 62, n. 9, p. 2272-2278, Sept. 2012.

SILVA, A. T. **Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro**. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, K. et al. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 3, p. 175-82, May 2012.

SILVA, K. **Identificação and funcional characterization of diazotrophic  $\beta$ -proteobacteria from brazilian soils.** 2009. 124 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SILVA, M. F. F.; SECCO, R. S.; LOBO, M. G. A. Aspectos ecológicos da vegetação rupestre da serra dos carajás, estado do Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 1-2, p. 17-44, 1996.

SILVA, S.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos no crescimento e extração de metais pesados pela *Brachiaria decumbens* Stapf. em solo multicontaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, dez. 2006.

SILVEIRA, F. A. O.; FERNANDES, F.; FERNANDES, G. W. Light and temperature influence on seed germination of *Calliandra fasciculata* Benth. (Leguminosae). **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 6, n. 2, p. 95-97, 2005.

SILVEIRA, F. A. O.; FERNANDES, G. W. Effect of light, temperature and scarification on the germination of *Mimosa foliolosa* (Leguminosae) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, n. 3, p. 585-592, Oct. 2006.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3. ed. London: Academic Press, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Plantarum, 2005.

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

SY, A. et al. Methylo-trophic Methylobacterium nodulate and fix-nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, Fev. 2001.

TALBI, C. et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulation *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 13, p. 4587-4591, July 2010.

TEMPERTON, V. M. et al. Positive interactions between nitrogen-fixing legumes and four different neighboring species in a biodiversity experiment. **Oecologia**, Berlin, v. 151, n. 12, p. 190-205, Mar. 2007.

THE SER INTERNATIONAL PRIMER ON ECOLOGICAL RESTORATION. [S.l.]: SER, 2004. Disponível em: <[http://www.ser.org./content/ecological\\_restoration\\_primer.asp](http://www.ser.org./content/ecological_restoration_primer.asp)>. Acesso em: 16 maio 2013.

THRALL, P. H. et al. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 740-751, Aug. 2005.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 743-753, 2001.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 743-753, 2001.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A. Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.

TRUJILLO, M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

VALVERDE, A. et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, Sept. 2005.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.

VANDAMME, P. et al. *Campylobacter hyoilei* Alderton 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chaletain 1973 are subjective synonyms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 1055-1060, 1997.

VANDAMMEL, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 4, p. 507-512, Dec. 2002.

VINUESA, P. et al. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 2, p. 569-575, Mar. 2005.

WHELAN, R. J. **The ecology of fire**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 33, n. 1, p. 35-43, Jan. 2010.

WUTKE, E. B. et al. Adubação verde no Estado de São Paulo. **Boletim Técnico**, n. 249, Campinas, n. 249, jun. 2009.

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

ZHANG, H. et al. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., 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.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

#### EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE *Burkholderia* EM LEGUMINOSAS E IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES ORIUNDAS DE CAMPOS RUPESTRES

Kaliane S. Araújo, Fernanda de Carvalho, Fatima M. S. Moreira

##### Resumo

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de *Burkholderia* em *Macroptilium atropurpureum* (DC.), *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze e *Mimosa foliolosa* Benth e identificar bactérias provenientes de nódulos de plantas iscas cultivadas em solos de distintos habitats de campos rupestres da Serra do Cipó, MG. Para o teste de nodulação e eficiência simbiótica em *M. atropurpureum* (DC.) foram utilizadas garrafas recicladas do tipo *long neck*, contendo solução de Hoagland, e os experimentos com as espécies florestais foram realizados em tubetes (240 cm<sup>3</sup>) contendo areia e vermiculita (1:2), ambos tendo como controles negativos os tratamentos sem inoculação, contendo 5, 25 mg L<sup>-1</sup> e 52,5 mg L<sup>-1</sup> de N mineral. A estirpe de referência simbiótica para *M. atropurpureum* foi a UFLA 04-212 e o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, por um período de 40 dias. Nos experimentos de nodulação e eficiência simbiótica em *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, espécies nativas dos domínios atlântico e cerrado, respectivamente, foram utilizadas as respectivas estirpes de referência, BR 3460 e UFLA 01-750, em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, por um período de 70 dias. Após estes períodos, foram avaliados: nodulação, matéria seca da parte aérea, da raiz e total, além de altura da planta, diâmetro, matéria seca de nódulos e o índice de qualidade de Dickson nas espécies nativas. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Das 15 estirpes de *Burkholderia* testadas, apenas UFLA 01-726 e UFLA 04-248 foram capazes de nodular *M. atropurpureum*, entretanto, foram ineficientes na promoção de crescimento vegetal, apesar de serem eficientes na fixação biológica do nitrogênio em *M. foliolosa*. Todas as estirpes de *Burkholderia* testadas estabeleceram simbiose com *M. bimucronata* e 12 estirpes

nodularam *M. foliolosa*. As estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 01-750 e as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750 e UFLA 01-751 promoveram o crescimento vegetal, respectivamente, em *M. bimucronata* e *M. foliolosa*. As estirpes dos diferentes grupos culturais foram identificadas com 98% a 100% de similaridade como pertencentes ao gênero *Bacillus* (13 estirpes), *Burkholderia* (13 estirpes), *Brevibacillus* (4 estirpes), *Paenibacillus* (3 estirpes), *Stenotrophomonas* (1 estirpe), *Lysinibacillus* (1 estirpe). Estirpes de *Burkholderia* atuam na promoção do crescimento vegetal de *M. bimucronata* e *M. foliolosa* e as características morfológicas e culturais utilizadas como parâmetro para o agrupamento das estirpes subestimaram a diversidade genética das mesmas.

**Palavras-chave:** Bactérias Fixadoras de Nitrogênio, Beta-proteobactérias, *Macropitium atropurpureum*, *Mimosa bimucronata*, *Mimosa foliolosa*.

## Abstrat

This work was carried out to evaluate the symbiotic effectiveness of strains *Burkholderia* in *Macroptilium atropurpureum* (DC.), *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze and *Mimosa foliolosa* Benth and identify bacteria from nodules of bait plants grown in soils of different habitats of rocky fields from *Serra do Cipó, MG*. For nodulation ability as well as symbiotic efficiency in *M. atropurpureum* (DC.) it was used long neck recycled bottles containing Hoagland and the trials with forest species were performed in tubes (240 cm<sup>3</sup>) containing sand and vermiculite (1:2), both as negative controls the treatments without inoculation containing 5, 25 mg L<sup>-1</sup> and 52.5 mg L<sup>-1</sup> of N mineral. The strain of symbiotic reference for *M. atropurpureum* was UFLA 04-212 and the experiment was conducted in a completely randomized design with three replications, for a period of 40 days. In the experiments of nodulation and symbiotic efficiency in *M. bimucronata* and *M. foliolosa* native species from Atlantic and the Cerrado, respectively, were used in their reference strains BR 3460 and UFLA 01-750 in a completely randomized design with six replicates for 70 days. After this period, were evaluated: nodulation, dry matter of shoots, root and total, as well as plant height, diameter, dry weight of nodules and Dickson quality index in native species. Data were subjected to variance analysis and comparison of averages by Scott Knott test at 5% of probability. From 15 strains of *Burkholderia* tested, only UFLA 01-726 and UFLA 04-248 were able to nodular *M. atropurpureum*, however, were ineffective in promoting plant growth, although efficient in biological nitrogen fixation in *M. foliolosa*. All tested strains of *Burkholderia* have established symbiosis with *M. bimucronata* and 12 strains have nodulated *M. foliolosa*. The strains UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 and UFLA 01-750 and the strains UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750, UFLA 01-751 promoted plant growth, respectively, in *M. bimucronata* and *M. foliolosa*. Strains of different cultural groups were identified, with 98% to 100% similarity, as belonging the genus *Bacillus* (13 strains), *Burkholderia* (13 strains), *Brevibacillus* (4 strains), *Paenibacillus* (3 strains), *Stenotrophomonas* (1 strain) and *Lysinibacillus* (1 strain). *Burkholderia* strains act in promoting plant growth of *M. bimucronata* and *M. foliolosa* and the morphological and cultural characteristics used as a parameter for the grouping of strains underestimated the genetic diversity of the same.

**Keywords:** Nitrogen-fixing bactéria. Beta-proteobacteria. *Macroptilium atropurpureum*. *Mimosa bimucronata*. *Mimosa foliolosa*.

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* ocupam uma variedade de nichos ecológicos e são exploradas para fins de controle biológico, biorremediação e promoção de crescimento de plantas (Coeny et al., 2003). Entretanto, apenas em 2001 é que se teve o conhecimento de que estirpes de *Burkholderia* são capazes de estabelecer simbiose e formar nódulos em leguminosas, mesmo que ineficientes (Moulin et al., 2001). Esta era uma propriedade até então atribuída somente às bactérias da subclasse  $\alpha$ -proteobactéria, agrupadas nos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (Vandame et al., 2002).

Desde então, tem sido constatada a capacidade das espécies de *Burkholderia* de formar nódulos em *Macroptilium atropurpureum* (DC) (Moulin et al., 2001; Elliot et al., 2007; Lima et al., 2009; Angus et al., 2013), em espécies de *Cyclopia* (Elliot et al., 2007), em *Vigna unguiculata* (Soares, 2009), em *Phaseolus vulgaris* (Talbi et al., 2010) e também em espécies de *Mimosa* sp. (Chen et al., 2003; 2005; 2006; Barret; Parker, 2005; Reis et al., 2010). Em diversos trabalhos tem sido observada a afinidade de leguminosas da subfamília Mimosoideae por bactérias nodulíferas do gênero *Burkholderia*, como os realizados por Chen et al. (2003), em que a maioria das 190 bactérias obtidas a partir de nódulos de *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha*, em Taiwan, pertenciam à classe  $\beta$ -proteobactéria e por Chen et al. (2005), ao isolarem vinte estirpes pertencentes ao gênero *Burkholderia* de leguminosas da subfamília Mimosoideae provenientes do Brasil e da Venezuela.

Em estudos posteriores, Barrett e Parker (2005) verificaram a predominância de *Burkholderia* spp. em nódulos radiculares em *Mimosa pigra*, *Mimosa casta*, *Mimosa pudica*, *Abarema macradenia* e *Pithecellobium*

*hymenaeafolium* na ilha de Barro Colorado, no Panamá, e Chen et al. (2006) obtiveram quatorze isolados, identificados como *B. mimosarum*, a partir de nódulos de *M. pigra* e *M. scabrella*, oriundos da Venezuela, Brasil e Taiwan.

Em um extenso levantamento de nodulação em *Mimosa* spp., realizada em dois grandes biomas do Brasil, cerrado e caatinga, verificou-se que estirpes de *Burkholderia* são os simbiontes predominantes nestes dois centros de diversidade, sendo capazes de nodular espécies de mimosas raras, endêmicas e ameaçadas de extinção, tais como *M. splendida*, *M. setosissima*, *M. decorticans*, *M. calodendron*, *M. campicola*, *M. dominarum*, *M. gatesiae*, *M. irrigua*, *M. pseudosepiaria*, *M. Pyrenea*, *M. Regina*, *M. setuligera*, *M. skinneri*, *M. speciosissima*, *M. ulbrichiana*, *M. verecunda*, *M. callithrix* e *M. cordistipula*, portanto, contribuindo para o ciclo do nitrogênio e a manutenção de ecossistemas frágeis do cerrado e da caatinga (Reis et al., 2010).

Do total de 148 estirpes isoladas de nódulos de 47 espécies de *Mimosa* oriundas da América do Sul, o gênero *Burkholderia* apresentou maior destaque, devido à sua predominância na identificação de estirpes capazes de estabelecer simbiose com essas espécies de plantas (Bontemps et al., 2010).

Mishra et al. (2011), ao avaliarem a diversidade genética de 221 bactérias simbiontes de *M. pudica* em oito tipos de solos de diversos ambientes da Guiana Francesa, encontraram grande diversidade de beta-rizóbio, como *Burkholderia phymatum* e *Burkholderia tuberum*, sendo as primeiras as mais frequentes das estirpes identificadas, *Burkholderia mimosarum*, *Burkholderia* sp. e *Cupriavidus taiwanensis*.

Florentino et al. (2009) relataram, pela primeira vez no Brasil e na América do Sul, a existência de estirpes de rápido crescimento e com reações alcalinas em meio de cultivo pertencentes ao gênero *Cupriavidus*, obtidas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala*. Posteriormente, Silva et al. (2012) identificaram essas estirpes como

*Cupriavidus necator* e constataram a capacidade destes de nodular *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia*, *M. atropurpureum* e *Vigna unguiculata*.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com a finalidade de verificar a capacidade de nodulação e eficiência simbiótica de estirpes de *Burkholderia* em *M. atropurpureum*, *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa*, bem como identificar bactérias provenientes de nódulos de plantas iscas, *M. atropurpureum* e *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret, cultivadas em solos de distintos habitats de campos rupestres da Serra do Cipó, MG.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Origem dos isolados bacterianos

As estirpes bacterianas em estudo pertencem à Coleção de Culturas de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (CCBPCV), no Setor de Biologia, Microbiologia e Processo Biológico do Solo (SBMPBS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e foram isoladas de nódulos de *M. atropurpureum* e *M. tenuiflora* cultivadas em solos de distintos habitats de campos rupestres (afloramento rochoso, brejo tufoso, campo arenoso, campo pedregoso e cerrado), localizadas na Serra do Cipó, MG (de Carvalho, 2010).

Do total de 51 isolados bacterianos (Tabela 1), 16 estirpes de *Burkholderia*, classificadas como representantes de grupos culturais, de acordo as características morfológicas e culturais, por de Carvalho et al. (2010) (Tabela 2), foram testadas quanto à eficiência simbiótica em *M. atropurpureum*, *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, e as demais estirpes (35 bactérias) tiveram o gene 16S rRNA parcialmente sequenciado no presente estudo.

Tabela 1 Grupo cultural, código de identificação, local de origem e planta hospedeira das estirpes em estudo (de Carvalho, 2010)

GRUPO CULTURAL	CÓDIGO ORIGINAL	CÓDIGO UFLA	LOCAL DE ORIGEM	PLANTA HOSPEDEIRA
-----	-----	UFLA 04-212 <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Moreira, 2006)	Amazônia	<i>M. atropurpureum</i>
-----	-----	BR 3460 <i>Burkholderia gladioli</i> (Faria et al., 1997)	-----	<i>M. bimucronata</i>
Grupo 1				
	21A-1	UFLA 01-731	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 2				
	12A-5	UFLA 01-726	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	15A-4	UFLA 01-783	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 3				
	46B-3	UFLA 04-260	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Arenoso	<i>M. atropurpureum</i>
	55A-9	UFLA 01-802	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Pedregoso	<i>M. tenuiflora</i>
	47A-1	UFLA 01-800	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Arenoso	<i>M. tenuiflora</i>
	28A-5	UFLA 01-794	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
	28A-8B	UFLA 01-797	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 4				
	15A-8	UFLA 01-753	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 5				
	12A-1	UFLA 01-750	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>

Tabela 1, continuação

GRUPO CULTURAL	CÓDIGO ORIGINAL	CÓDIGO UFLA	LOCAL DE ORIGEM	PLANTA HOSPEDEIRA
	35B-3A	UFLA 04-443	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. atropurpureum</i>
Grupo 6				
	17A-2	UFLA 01-788	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 7				
	16A-8	UFLA 01-787	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	39B-6	UFLA 04-405	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. atropurpureum</i>
	55A-8	UFLA 01-758	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Pedregoso	<i>M. tenuiflora</i>
	45A-5	UFLA 01-799	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
	28A-9	UFLA 01-759	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
	18A-2	UFLA 01-748	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 8				
	12A-3	UFLA 01-725	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	15A-6	UFLA 01-784	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 9				
	21A-6A	UFLA 01-744	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 10				
	11B-7	UFLA 04-249	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG,	<i>M. atropurpureum</i>



Tabela 1, continuação

GRUPO CULTURAL	CÓDIGO ORIGINAL	CÓDIGO UFLA	LOCAL DE ORIGEM	PLANTA HOSPEDEIRA
	43B-7B	UFLA 04-444	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. atropurpureum</i>
	53B-1B	UFLA 04-246	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Pedregoso	<i>M. atropurpureum</i>
Grupo 11				
	9A-7	UFLA 01-690	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 12				
	15A-7	UFLA 01-733	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 13				
	28A-1B	UFLA 01-792	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 14				
	12A-8	UFLA 01-728	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 15				
	5B-2	UFLA 04-442	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Arenoso	<i>M. atropurpureum</i>
	45A-3	UFLA 01-798	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 16				
	28A-7A	UFLA 01-795	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 17				
	12A-6	UFLA 01-692	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	28A-1A	UFLA 01-739	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento	<i>M. tenuiflora</i>



Tabela 1, continuação

GRUPO CULTURAL	CÓDIGO ORIGINAL	CÓDIGO UFLA	LOCAL DE ORIGEM	PLANTA HOSPEDEIRA
Grupo 18				
	45A-1	UFLA 01-732	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 19				
	10B-6B	UFLA 04-248	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. atropurpureum</i>
Grupo 20				
	55A-5	UFLA 01-801	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Campo Pedregoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 21				
	13A-9	UFLA 01-756	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	13B-1	UFLA 04-268	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 22				
	38B-3	UFLA 04-274	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. atropurpureum</i>
Grupo 23				
	16A-3	UFLA 01-786	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 24				
	21A-2	UFLA 01-757	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 25				
	28A-6	UFLA 01-751	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 26				
	16A-2	UFLA 01-785	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>

Tabela 1, conclusão

GRUPO CULTURAL	CÓDIGO ORIGINAL	CÓDIGO UFLA	LOCAL DE ORIGEM	PLANTA HOSPEDEIRA
	17A-7	UFLA 01-789	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
	27A-1	UFLA 01-791	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo ufoso	<i>M. tenuiflora</i>
	12A-4	UFLA 01-781	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 27				
	20A-1A	UFLA 01-790	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 28				
	9A-9	UFLA 01-780	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 29				
	28A-4A	UFLA 01-793	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Afloramento Rochoso	<i>M. tenuiflora</i>
Grupo 30				
	43B-8B	UFLA 04-445	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Brejo Turfoso	<i>M. atropurpureum</i>
Grupo 31				
	12B-1	UFLA 04-269	Campo Rupestre, Serra do Cipó, MG, Cerrado	<i>M. atropurpureum</i>

Tabela 2 Especificação das 15 estirpes de *Burkholderia* utilizadas em ensaios de autenticação e eficiência simbiótica na fixação biológica de nitrogênio em *Macroptilium atropurpureum*, *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa*, mais a estirpe UFLA 01-750, utilizada como referência para capacidade de nodulação em *M. foliolosa* (de Carvalho, 2010)

Código Original	Código UFLA	Grupo Cultural	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
				Espécies	Similaridade %	Número de acesso
21A-1	UFLA 01-731	Grupo 1	1272	<i>Burkholderia nodosa</i>	99	AY773192
12A-5	UFLA 01-726	Grupo 2	519	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
46B-3	UFLA 04-260	Grupo 3	800	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543722
15A-8	UFLA 01-753	Grupo 4	1246	<i>B. nodosa</i>	99	AY773192
12A-1	UFLA 01-750	Grupo 5	773	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
39B-6	UFLA 04-405	Grupo 7	778	<i>Burkholderia</i> sp.	97	AB366316
18A-2	UFLA 01-748	Grupo 7	725	<i>Burkholderia</i> sp.	100	FN543681
21A-6A	UFLA 01-744	Grupo 9	866	<i>Burkholderia</i> sp.	100	FN543748
11B-7	UFLA 04-249	Grupo 10	1137	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543720
15A-7	UFLA 01-733	Grupo 12	678	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543723
28A-1A	UFLA 01-739	Grupo 17	883	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543691
45A-1	UFLA 01-732	Grupo 18	619	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543777
10B-6B	UFLA 04-248	Grupo 21	710	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN54379
13A-9	UFLA 01-756	Grupo 21	901	<i>B. nodosa</i>	99	AY773192
28A-6A	UFLA 01-751	Grupo 28	879	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543677
12B-1	UFLA 04-269	Grupo 35	839	<i>Burkholderia</i> sp.	99	EU219864

## **2.2 Autenticação e eficiência simbiótica das estirpes de *Burkholderia* em diferentes leguminosas**

As 15 estirpes representantes dos distintos grupos culturais, identificadas como *Burkholderia* sp. (UFLA 01-731, UFLA 01-726, UFLA 04-260, UFLA 01-753, UFLA 01-750, UFLA 04-405, UFLA 01-748, UFLA 01-744, UFLA 04-249, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-732, UFLA 04-248, UFLA 01-751, UFLA 04-269) (Tabela 2), foram testadas quanto à capacidade de induzir nódulos e à eficiência da fixação biológica do nitrogênio em *M. atropurpureum*, *M. Bimucronata* e *M. foliolosa*, em condições de casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo, no Setor de Biologia, Microbiologia e Processo Biológico do Solo (SBMPBS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.2.1 *Macropitilium atropurpureum* (DC.) Urb**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de 17 de setembro de 2013 a 28 de outubro de 2013, quando a temperatura média variou entre 15,8 °C a 26,9 °C. Os 15 isolados bacterianos em estudo, mais a estirpe de referência UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium* sp.) (Florentino et al., 2009), foram inoculados na espécie *M. atropurpureum* (siratro) para verificar a capacidade de nodulação e sua eficiência para fixação biológica de nitrogênio.

As plantas foram cultivadas em garrafas de vidro âmbar de 500 mL, recicláveis, tipo *long neck*, contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), composta com uma mínima quantidade de N mineral (5,25 mg L<sup>-1</sup>), e inoculadas com as estirpes em teste, tendo como no controle positivo o tratamento com a estirpe UFLA 04-212.

Garrafas contendo apenas a mínima quantidade de N mineral ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) e a outra com concentração de nitrogênio necessário para o bom desenvolvimento das plantas ( $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de N mineral) foram utilizadas como controles negativos.

A concentração mínima de N mineral na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) é considerada uma dose de arranque para o processo de fixação biológica de nitrogênio, tendo como composição  $0,1 \text{ mL L}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $0,6 \text{ mL L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ;  $0,4 \text{ mL L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $2 \text{ mL L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $3 \text{ mL L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ ;  $10 \text{ mL L}^{-1} \text{ Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $200 \text{ mL L}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $2,86 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ;  $2,03 \text{ g L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $10 \text{ mL L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . No controle negativo com a presença de nitrogênio utilizou-se a solução completa de Hoagland e Arnon (1950),  $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de N mineral ( $1 \text{ mL L}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ;  $6 \text{ mL L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ;  $4 \text{ mL L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $2 \text{ mL L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $2,86 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ;  $2,03 \text{ g L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $10 \text{ mL L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

Após o preparo das garrafas com uma tira de papel filtro, fita adesiva, papel alumínio e a solução nutritiva, estas foram autoclavadas, por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$  e a  $127 \text{ }^\circ\text{C}$ .

As sementes foram desinfestadas e escarificadas com ácido sulfúrico concentrado P. A. (Sigma ®), por 20 minutos, com lavagens sucessivas em água esterilizada, em condições assépticas de câmara de fluxo, e embebidas em água esterilizada por 60 minutos (Almeida et al., 1979). Posteriormente, foram imersas em água esterilizada, por 2 horas, transferidas para placas de Petri com algodão umedecido, esterilizadas em autoclave por 20 minutos e incubadas, por 3 dias, a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , antes de serem plantadas.

As sementes pré-germinadas foram inseridas manualmente no orifício da garrafa com auxílio de uma pinça estéril, sendo utilizada uma plântula por

frasco, seguida da inoculação de 2 mL da suspensão bacteriana, cultivada em meio de cultura 79 (Fred & Waskman, 1928) líquido, por 3 dias, para as estirpes de *Burkholderia* testadas e 5 dias para a estirpe UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium* sp.), utilizada como controle positivo.

O experimento foi conduzido por 40 dias com 18 tratamentos, sendo 15 referentes aos isolados em teste, 1 controle positivo com a inoculação da estirpe *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 04-212), com comprovada eficiência quanto à capacidade de fixação de nitrogênio em simbiose com o siratro (Florentino, 2009) e 2 controles negativos, com apenas a mínima quantidade de N mineral ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) e contendo  $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de N mineral, ambas sem inoculação de bactéria, e em delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

Após este período, foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de nódulos nas raízes, matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca total (MST), cujo resultado é obtido pela soma da MSPA e MSR. Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar, versão 5.3 (Ferreira, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e os gráficos foram obtidos pelo programa estatístico R.

### **2.2.2 *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze e *Mimosa foliolosa* Benth. subsp. pachycarpa ( Benth)**

Os experimentos de nodulação e eficiência simbiótica das estirpes em estudo, em duas espécies de leguminosas nativas, *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, foram realizados, respectivamente, nos períodos de 22 de julho a 02 de

outubro de 2013 e 16 de setembro a 25 de novembro de 2013, quando as temperaturas médias variaram entre 12,9 °C a 26 °C e 16,3 °C a 27,1 °C.

As plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno com capacidade volumétrica de 240 cm<sup>3</sup>, contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção 1:2 (a:v), adicionados de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland; Arnon, 1950), de acordo com a necessidade das plantas.

Para o processo de germinação, as sementes de *M. bimucronata* passaram pelo processo de quebra de dormência por 10 minutos em ácido sulfúrico concentrado e, em seguida, lavadas sucessivamente, em água esterilizada (Ribas et al., 1996) e as sementes de *M. foliolosa* foram colocadas em ácido sulfúrico, durante 10 minutos e lavadas em água corrente, por 30 minutos (Silveira; Fernandes, 2006). As sementes de ambas as espécies foram transferidas para placas de Petri, contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada, e incubadas por cinco dias, a 28 °C, antes de serem plantadas.

No momento do plantio, foi colocada uma semente germinada em cada tubete e, uma semana após o plantio, foi feita a inoculação com 2 mL de suspensões das estirpes de *Burkholderia* (Tabela 2). Para isso, elas foram cultivadas em meio “79” (Fred; Waksman, 1928), também conhecido como YMA (Vincent, 1970), semissólido, por três dias.

O experimento foi conduzido por 70 dias, em delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), com 8 repetições e com 18 tratamentos. Destes tratamentos, 15 foram referentes aos isolados em teste (Tabela 2), 1 controle positivo com a inoculação da BR 3460 (*B. gladioli*), estirpe de referência para a fixação biológica do nitrogênio em *M. bimucronata* (Faria et al., 1997) e UFLA 01-750, estirpe selecionada por apresentar capacidade de nodulação e eficiência em *M. foliolosa*, em ensaios realizados no laboratório, além dos 2 controles

negativos, sem a inoculação de estirpe, cujas mudas foram regadas com a solução nutritiva de Hoagland (Hoagland; Arnon, 1950) a  $\frac{1}{4}$  de força, com apenas a mínima quantidade de N mineral ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) e com  $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de N mineral, conforme descrito anteriormente.

Após este período, foram avaliados os seguintes parâmetros: altura e diâmetro da planta, número de nódulos (NN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e dos nódulos (MSN), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), obtida pelo somatório da MSPA com a MSR e o índice de qualidade de Dickson, obtido pela fórmula:  $\text{IQD} = [\text{matéria seca total}/(\text{RAD} + \text{RPAR})]$ , em que RPAR é a relação da matéria seca da parte aérea com a matéria seca de raízes, e RAD é a relação da altura da parte aérea com o diâmetro do coleto (Dickson et al., 1960). Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar, versão 5.3 (Ferreira, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e as médias originais de NN e MSN sofreram transformações pela raiz quadrada –  $\text{SQRT}(y)$ . Os gráficos foram obtidos pelo programa estatístico R.

### **2.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA das estirpes bacterianas**

O DNA das 35 estirpes bacterianas (Tabela 1) foi extraído pelo método de lise alcalina, como descrito por Niemann et al. (1997), a partir de células cultivadas em três dias em meio de cultivo “79” (Fred & Wasksman, 1928). Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). Alíquotas de  $5 \mu\text{L}$  do *template* dos DNA extraídos das estirpes foram utilizadas para  $50 \mu\text{L}$  de reação de PCR. A concentração final dos reagentes por reação foi de  $5 \mu\text{L}$  tampão 10X

para PCR, 5µL dNTP Mix (0,2 mM de cada), 5 µL (2,5 mM) de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µM de cada *primer* (27F e 1492R), 0,4 µL de *Taq* DNA Polimerase e água Mili-Q para completar a reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>, nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C, por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (94 °C, por 40 segundos), anelamento (55 °C, por 40 segundos), extensão (72 °C, por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final de 72 °C, por 7 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coreia), para sequenciamento e purificação. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI.

Para a realização do alinhamento pelo programa Clustal W (Thompson et al., 1994), foram obtidas sequências similares no GenBank (NCBI). As sequências alinhadas foram utilizadas para análise filogenética pelo método Neighbour-Joining, usando Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) pelo programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013), aplicando um *bootstrap* com um mínimo de 1.000 replicações.

### 3 RESULTADOS

#### **Nodulação e eficiência simbiótica das estirpes de *Burkholderia* em *Macroptilium atropurpureum*, *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa***

Na análise de promoção de crescimento vegetal das mudas de *M. atropurpureum*, *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, inoculadas com estirpes de *Burkholderia*, puderam-se verificar resultados significativos entre os diferentes parâmetros avaliados (Tabela 3).

Apenas as estirpes UFLA 01-726, UFLA 04-248 e a estirpe de referência UFLA 04-212 foram capazes de nodular *M. atropurpureum* e não foi verificada a presença de nódulos nos tratamentos controle com nitrogênio mineral e com concentração mínima de nitrogênio mineral, indicando a ausência de contaminação no experimento (Figura 1).



Figura 1 Diferenças quanto às características de crescimento apresentadas pelas plantas de *Macropodium atropurpureum*, nos diferentes tratamentos em resposta à eficiência na fixação biológica do nitrogênio (A.) (B.). Dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral, o tratamento com a estirpe de referência, UFLA 04-212, o tratamento com a estirpe UFLA 01-726 (1A.) e UFLA 04-248 (1B.). Presença de nódulos nos tratamentos com a estirpe utilizada como referência e que apresentou eficiência simbiótica UFLA 04-212 (C.) e nos tratamentos com as estirpes UFLA 01-726 (D.) e UFLA 04-248 (E.) que, apesar de conterem nódulos em suas raízes, não obtiveram eficiência simbiótica na fixação biológica do nitrogênio

(...continua...)



As estirpes de *Burkholderia* em estudo, mesmo as estirpes UFLA 01-726 e UFLA 04-248, que foram capazes de induzir à formação de nódulos nas raízes de *M. atropurpureum*, não apresentaram resultados significativos quanto à promoção de crescimento vegetal. Os resultados obtidos para a matéria seca da parte aérea, em comparação com o tratamento em que houve a inoculação da estirpe de referência UFLA 04-212 e o tratamento com nitrogênio mineral, não foram significativos. Os mesmos resultados foram obtidos para a matéria seca total. As estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-732, UFLA 01-739, UFLA 01-753, UFLA 01-756 e UFLA 04-405 apresentaram valores de matéria seca da raiz inferiores aos das demais estirpes e aos tratamentos controle (Figura 2).

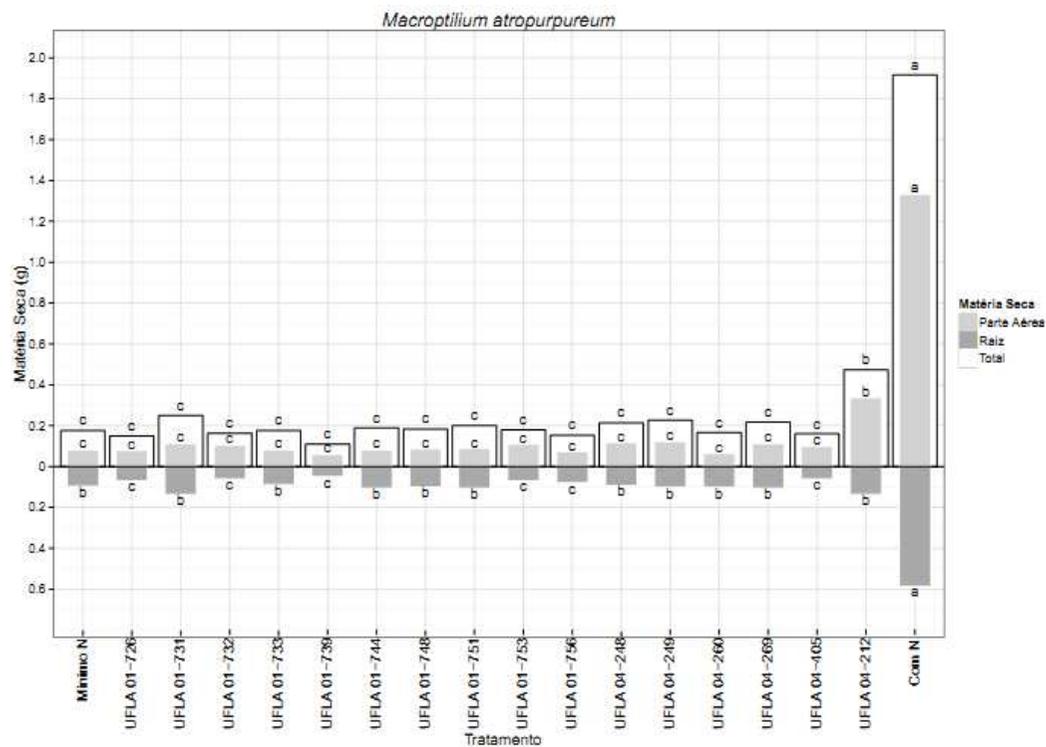


Figura 2 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g), com coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 45,27%, 23,30%, 31,34%, de *Macropitilium atropurpureum*, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral.\*Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Em relação à espécie *M. bimucronata*, todas as estirpes de *Burkholderia* foram capazes de nodular e apenas nos tratamentos controle com nitrogênio mineral e com concentração mínima de nitrogênio mineral não houve a presença de nódulos. O número de nódulos foi significativamente maior para as estirpes UFLA 01-732, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-753, UFLA 01-756, UFLA 04-248 e UFLA 04-405, quando comparadas com as demais estirpes avaliadas no estudo, apresentando valores estatisticamente similares aos da atual estirpe de referência na fixação biológica de nitrogênio para esta cultura (BR 3460) (Figura 3).

As médias do número de nódulos encontradas nos sete melhores tratamentos variaram entre 138 a 163 nódulos, enquanto os tratamentos que apresentaram valores intermediários variaram entre 58 a 100 nódulos e os tratamentos com menores quantidades de nódulos variaram entre 31 a 39 nódulos.

Os valores de matéria seca de nódulos foram maiores nos tratamentos com as estirpes UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-748 e UFLA 04-405, em *M. bimucronata*, cujos valores foram similares ao da estirpe de referência para esta espécie vegetal (BR 3460) (Figura 3).

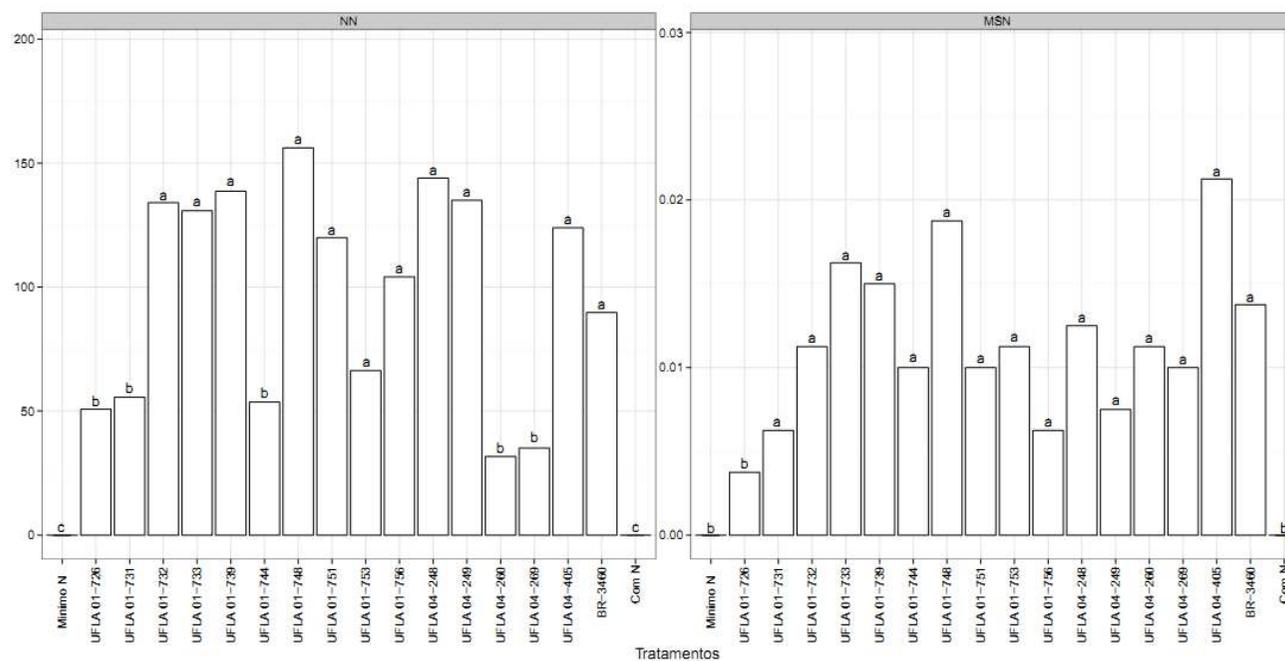


Figura 3 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), com coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 46,41% e 67,50%, em *Mimosa bimucronata*, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação da estirpe), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Quando avaliado o crescimento das plantas em altura, as estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-732, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-744, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-753, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-249, UFLA 04-260, UFLA 04-269, UFLA 04-405 e BR 3460 apresentaram resultados significativos em relação ao tratamento com nitrogênio. Para o crescimento em diâmetro do coleto, as estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-732, UFLA 01-739, UFLA 01-744, UFLA 01-748, UFLA 01-753, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 apresentaram resultados similares ao da estirpe de referência BR-3460 e ao tratamento com nitrogênio (Figura 4).

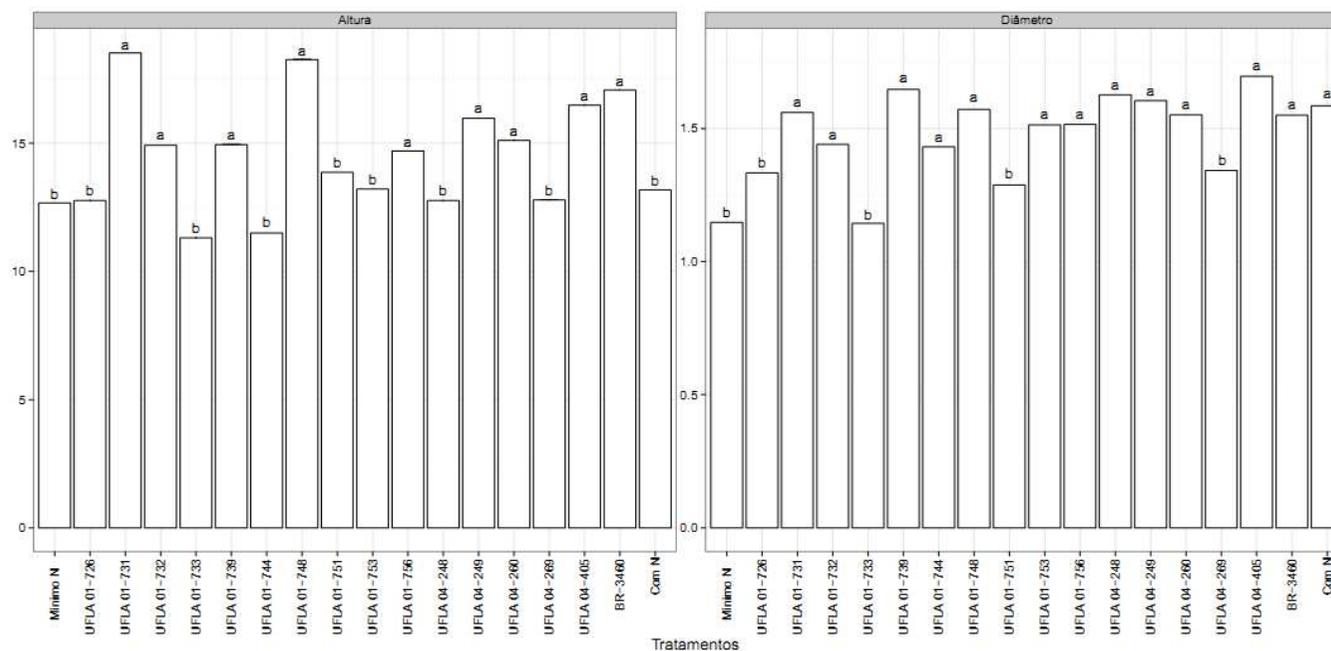


Figura 4 Altura e diâmetro do coleto em *Mimoso bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 26,52% e 16,64%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Em relação à matéria seca da parte aérea, os tratamentos com as estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 apresentaram valores significativos, os quais se equipararam ao tratamento com nitrogênio mineral e foram superiores ao tratamento com a estirpe de referência para eficiência na fixação biológica do nitrogênio (UFLA BR 3460) para *M. bimucronata* (Figura 5). Assim, estas estirpes apresentaram alta eficiência na fixação biológica do nitrogênio e atuaram na promoção do crescimento de *M. bimucronata*. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à matéria seca total e à matéria seca das raízes (Figura 5).

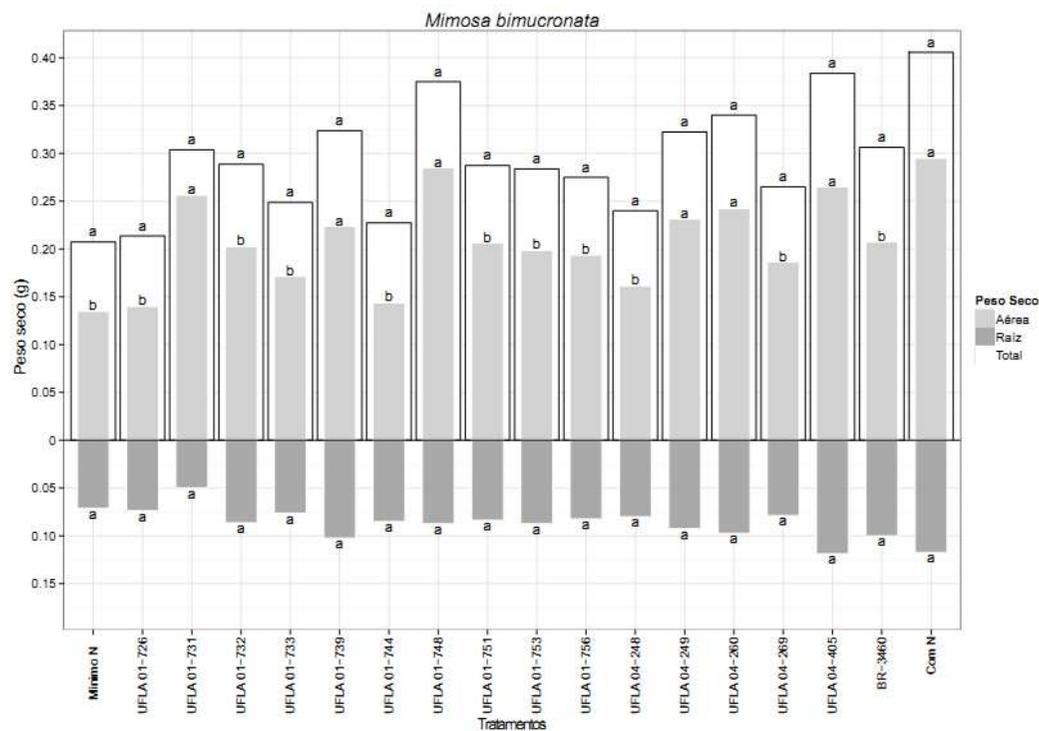


Figura 5 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g) de *Mimosa bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv), respectivamente, igual a 43,16%, 48,84% e 43,26%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Em relação ao Índice de Qualidade de Dickson (IQD), as estirpes UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-753, UFLA 04-248, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 apresentaram valores significativos e similares ao tratamento com nitrogênio (Figura 6).

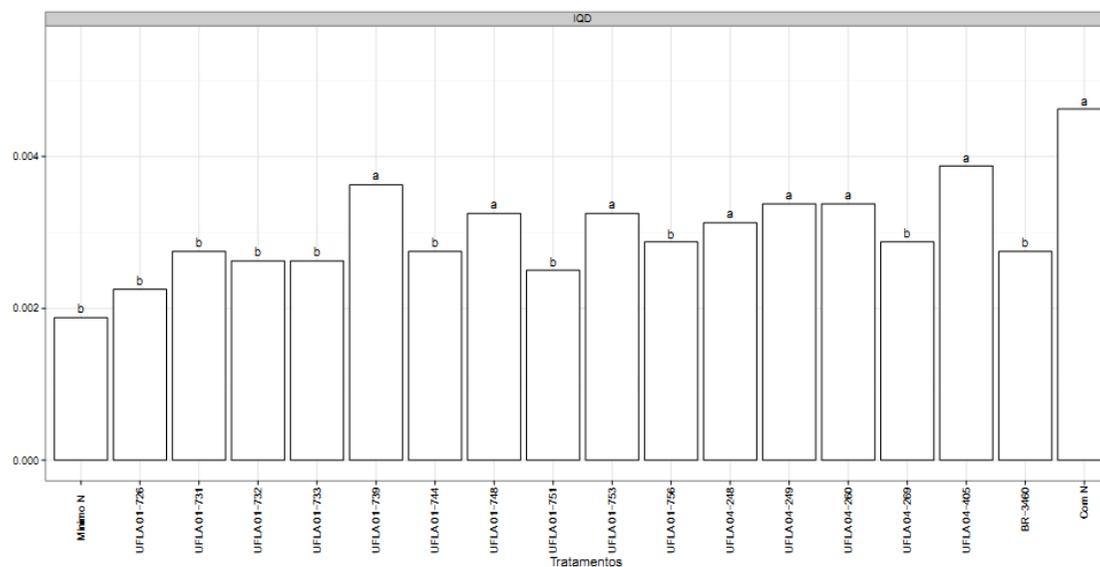


Figura 6 Índice de Qualidade de Dickson (IQD) em *Mimosa bimucronata*, tendo coeficiente de variância (cv) igual a 37, 38%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), sendo BR 3460 a estirpe recomendada e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Quanto à capacidade de nodulação das 15 estirpes avaliadas em *M. foliolosa*, 12 estirpes foram capazes de formar nódulos, UFLA 01-726, UFLA 01-732, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-753, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-260 e UFLA 04-405, além da estirpe UFLA 01-750, utilizada como controle positivo. Apenas nos tratamentos nos quais houve a inoculação das estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-744, UFLA 04-249 e UFLA 04-269, além dos controles negativos, não foi verificada a presença de nódulos (Figura 7).

Os tratamentos com as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-733, UFLA 01-748, UFLA 04-248 e a estirpe UFLA 01-750, utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), apresentaram maior quantidade de nódulos que os tratamentos com as estirpes UFLA 01-732, UFLA 01-739 e UFLA 01-405, e as estirpes UFLA 01-744, UFLA 01-751, UFLA 01-753, UFLA 01-756 e UFLA 04-260 obtiveram menores quantidades de nódulos (Figura 7).

As médias do número de nódulos encontradas nos quatro melhores tratamentos variaram entre 25 a 31, enquanto os tratamentos que apresentaram valores intermediários variaram entre 16 a 21 nódulos e os tratamentos com menor quantidade de nódulos variaram entre 1 a 5.

Dentre as estirpes nodulíferas, UFLA 01-726, UFLA 01-748, UFLA 04-248 e UFLA 01-750 apresentaram valores significativamente maiores em relação à matéria seca de nódulos, seguidas das estirpes UFLA 01-732, UFLA 01-733, UFLA 01-739 e UFLA 04-405 (Figura 7).

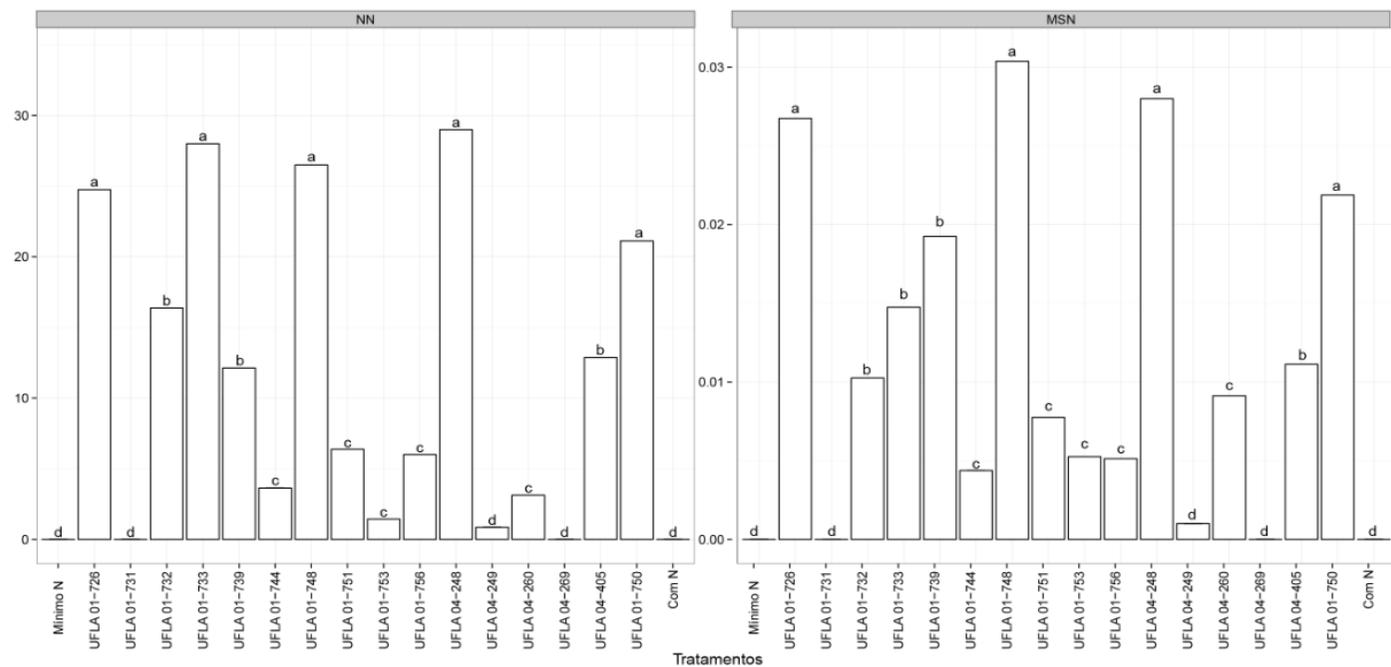


Figura 7 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) em *Mimosa foliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv), respectivamente, iguais a 62,36% e 71,64%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela 1 a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Em relação ao crescimento em altura das plantas e ao diâmetro do coletodo, os tratamentos inoculados com as estirpes em estudo apresentaram valores significativamente menores, em comparação ao tratamento com nitrogênio (Figura 8). As estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-744, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-405 e UFLA 01-750 obtiveram resultados similares ao do tratamento controle, sem inoculante, com a mínima concentração de nitrogênio mineral e as demais estirpes apresentaram valores inferiores ao mesmo, em relação ao crescimento em altura, assim como as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-756, UFLA 04-260 e UFLA 01-750, para o crescimento em diâmetro do coletodo (Figura 8).

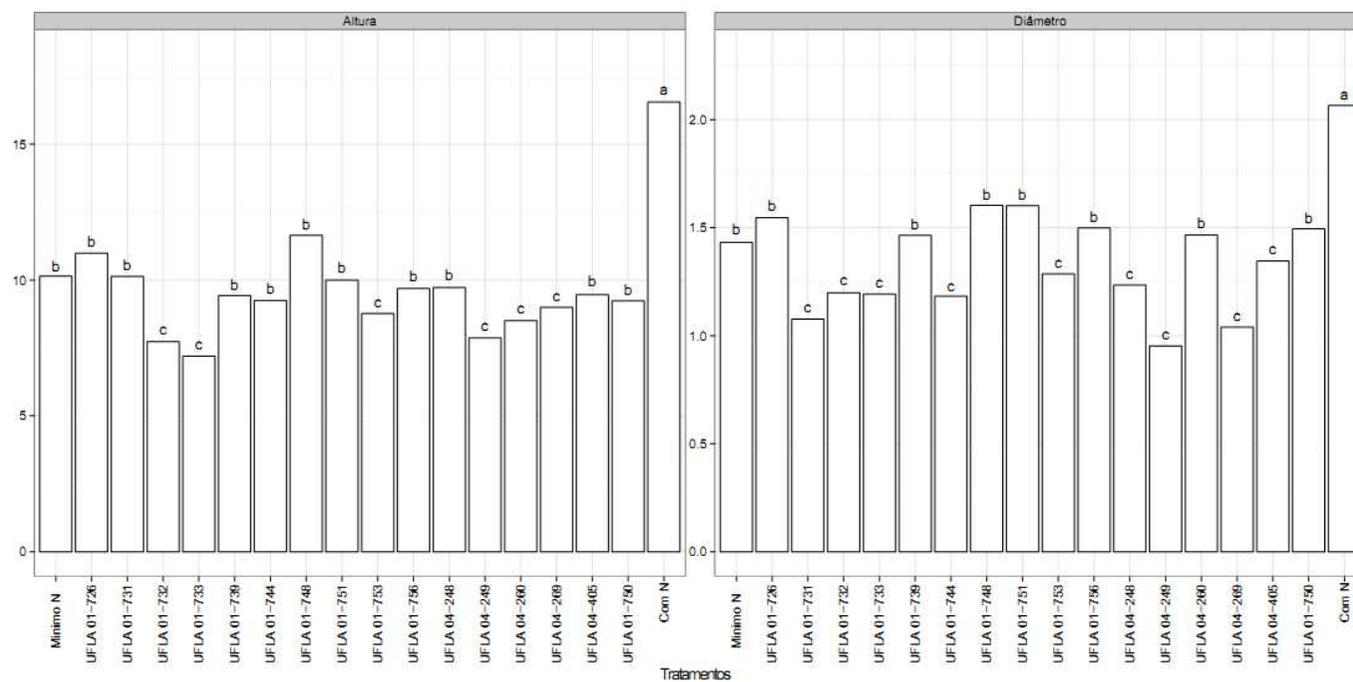


Figura 8 Altura e diâmetro do coletado em *Mimosafoliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv) respectivamente iguais a 21,27% e 27,44%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatística, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Para matéria seca total, todos os tratamentos apresentaram valores significativamente menores ao tratamento controle, sem inoculante, com nitrogênio mineral. As estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 04-405 e UFLA 01-750 obtiveram resultados similares ao do tratamento controle, sem inoculante, com a mínima concentração de nitrogênio mineral e os demais tratamentos apresentaram valores inferiores aos mesmos (Figura 9).

Para a produção de matéria seca das raízes, as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248 e UFLA 01-750 apresentaram valores significativos e similares ao do tratamento controle com nitrogênio mineral (Figura 9).

Em relação à matéria seca da parte aérea, todos os tratamentos não apresentaram resultados significativos, obtendo valores inferiores ao do tratamento controle com nitrogênio mineral, tendo as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-405 e UFLA 01-750 apresentado resultados similares ao do tratamento controle, sem inoculante, com a mínima concentração de nitrogênio mineral (Figura 9).

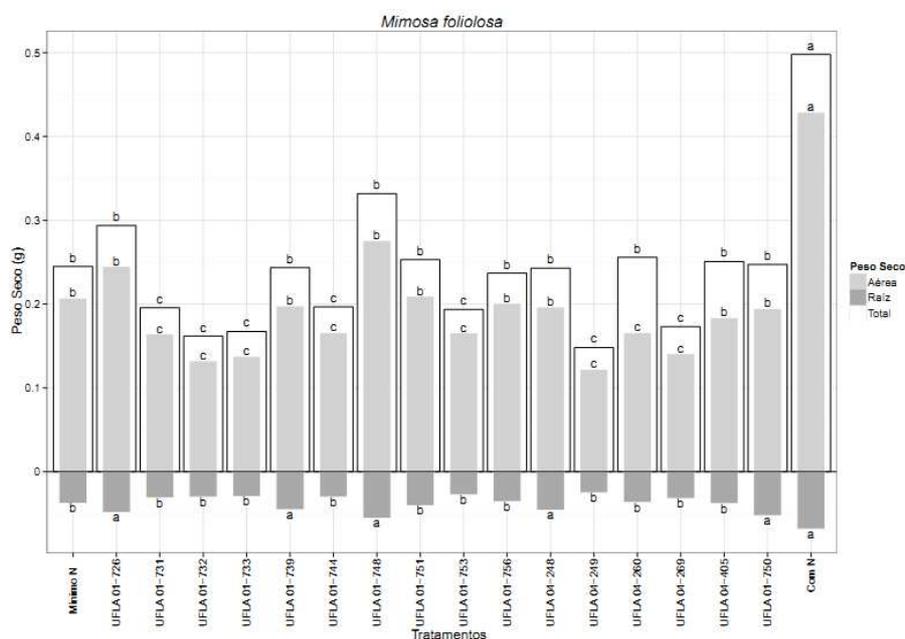


Figura 9 Matéria seca da parte aérea, das raízes e total (g) de *Mimosa foliolosa*, tendo coeficientes de variância (cv), respectivamente, iguais a 35,03%, 46,57% e 33,97%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela 1 a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

Em relação ao Índice de Qualidade de Dickson (IQD), todos os tratamentos apresentaram valores significativamente menores ao do tratamento controle, sem inoculante, com nitrogênio mineral. Entretanto, os tratamentos em que houve a inoculação das estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 04-260 e UFLA 01-750 apresentaram valores estatisticamente superiores aos dos tratamentos das demais estirpes e ao do tratamento controle com concentração mínima de nitrogênio mineral (Figura 10).

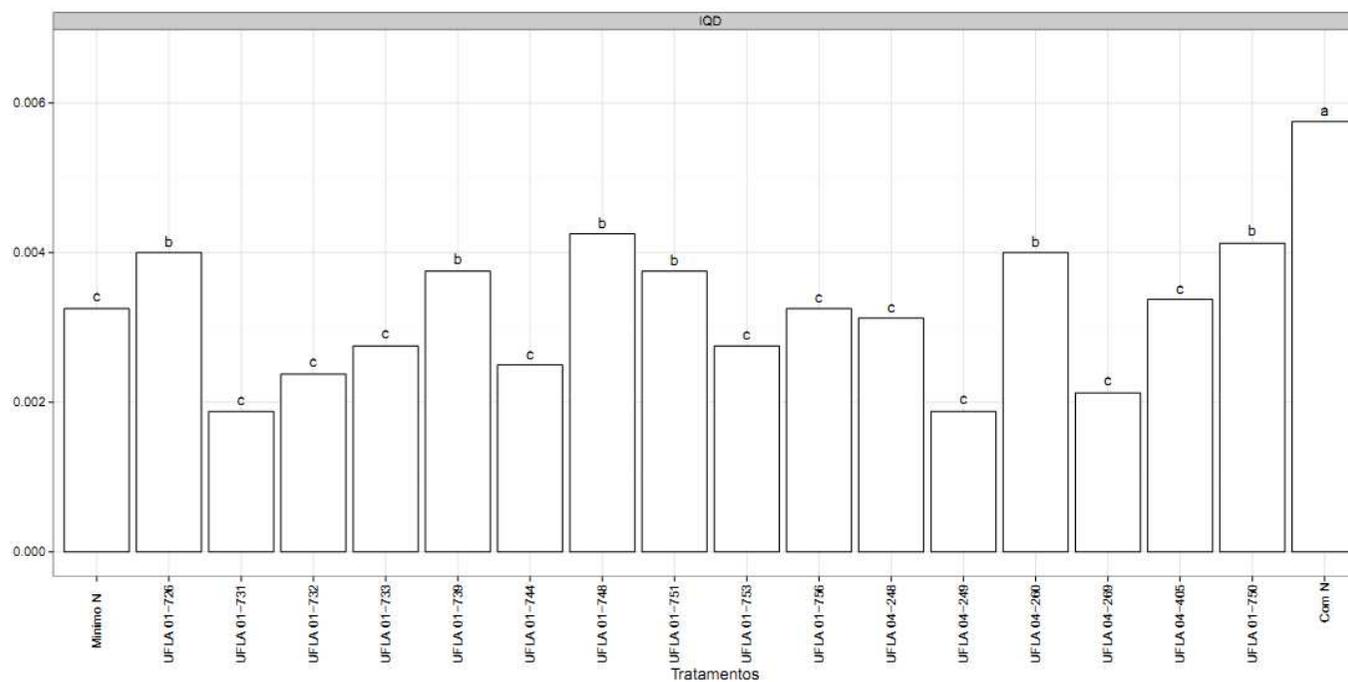


Figura 10 Índice de qualidade de Dickson, em *Mimoso foliolosa*, tendo coeficiente de variância (cv) igual a 42,56%, com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na Tabela a identificação das estirpes), UFLA 01-750, estirpe utilizada como referência por induzir a formação de nódulos em *M. foliolosa* em pré-ensaios (dados não publicados), os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (With N) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral. \*Colunas seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

De acordo com os dados apresentados, as estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 foram eficientes na fixação biológica do nitrogênio, promovendo o crescimento vegetal de *M. bimucronata*. Para a espécie *M. foliolosa*, as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-751 e UFLA 01-750 obtiveram os melhores resultados quanto à promoção de crescimento vegetal. Destas estirpes apresentadas, UFLA 01-748, UFLA 01-739 e UFLA 04-260 foram as que atuaram na promoção do crescimento vegetal de ambas as espécies florestais, *M. bimucronata* e *M. foliolosa*.

#### **Identificação das estirpes**

As sequências obtidas variaram de 1.272 a 467 pares de bases, as quais foram submetidas ao banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2014), para comparação dos dados com as estirpes tipo das espécies depositadas no mesmo.

As estirpes foram identificadas, com 98% a 100% de similaridade, como pertencentes aos gêneros de *Burkholderia*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*, nos diferentes grupos culturais (Tabela 3 e Figura 11).

Das 35 estirpes sequenciadas, 13 (37,1%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* e 13 (37,1%) como *Burkholderia*, sendo estes gêneros os mais encontrados, seguidos dos gêneros *Brevibacillus*, com quatro estirpes (11,4%); *Paenibacillus*, com três estirpes (8,6%) e, por fim, os gêneros *Lysinibacillus* e *Stenotrophomonas*, com apenas uma estirpe (2,9%) cada (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3 Identificação das estirpes dos diferentes grupos culturais, baseada nas sequências mais similares encontradas no Genbank (NCBI)

Grupo cultural	Estirpe	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
			Espécies	Similaridade %	Número de acesso
Grupo 1					
	UFLA 01-731	1272	<i>Burkholderia nodosa</i> (de Carvalho, 2010)	99	AY773192
Grupo 2					
	UFLA 01-726	519	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543721
	UFLA 01-783	1071	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	FJ719331
Grupo 3					
	UFLA 04-260	800	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543722
	UFLA 01-802	948	<i>Burkholderia nodosa</i>	99	AY533861
	UFLA 01-800	1184	<i>Bacillus subtilis</i>	99	EF423592
	UFLA 01-794	1118	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AY533861
	UFLA 01-797	1004	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CP006881
Grupo 4					
	UFLA 01-753	1246	<i>Burkholderia nodosa</i> (de Carvalho, 2010)	99	AY773192

Tabela 3, continuação

Grupo cultural	Estirpe	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
			Espécies	Similaridade %	Número de acesso
Grupo 5					
	UFLA 01-750	773	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho)	99	FN543721
Grupo 6					
	UFLA 01-788	1080	<i>Bacillus</i> sp.	99	HM566884
Grupo 7					
	UFLA 01-787	467	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KJ162241
	UFLA 04-405	778	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	97	AB 366316
	UFLA 01-758	946	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	FJ719350
	UFLA 01-799	1094	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JQ308588
	UFLA 01-759	1073	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99	KF261559
	UFLA 01-748	725	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	100	FN543681
Grupo 8					
	UFLA 01-725	1113	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
	UFLA 01-784	908	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CP006881
Grupo 9					
	UFLA 01-744	866	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	100	FN543748

Tabela 3, continuação

Grupo cultural	Estirpe	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
			Espécies	Similaridade %	Número de acesso
Grupo 10					
	UFLA 04-249	1137	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543720
	UFLA 04-444	1063	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546
	UFLA 04-246	1097	<i>Bacillus megaterium</i>	99	HF584899
Grupo 11					
	UFLA 01-690	949	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99	JQ744621
Grupo 12					
	UFLA 01-733	678	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543723
Grupo 13					
	UFLA 01-792	977	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CP006881
Grupo 14					
	UFLA 01-728	946	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
Grupo 15					
	UFLA 04-442	1069	<i>Burkholderia nodosa</i>	99	AY773192
	UFLA 01-798	999	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	GU328690
Grupo 16					
	UFLA 01-795	1155	<i>Burkholderia</i> sp.	99	CP006881

Tabela 3, continuação

Grupo cultural	Estirpe	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
			Espécies	Similaridade %	Número de acesso
Grupo 17	UFLA 01-692	1071	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
	UFLA 01-739	883	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543691
Grupo 18	UFLA 01-732	619	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543777
Grupo 19	UFLA 04-248	710	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN54379
Grupo 20	UFLA 01-801	869	<i>Brevibacillus nitrificans</i>	99	AB507254
Grupo 21	UFLA 01-756	901	<i>Burkholderia nodosa</i> (de Carvalho, 2010)	99	AY773192
	UFLA 04-268	1076	<i>Burkholderia</i> sp.	99	HF674684
Grupo 22	UFLA 04-274	860	<i>Burkholderia</i> sp.	99	CP006881
Grupo 23	UFLA 01-786	1073	<i>Burkholderia nodosa</i>	99	AM284971

Tabela 3, conclusão

Grupo cultural	Estirpe	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no Genbank		
			Espécies	Similaridade %	Número de acesso
Grupo 24	UFLA 01-757	951	<i>Burkholderia nodosa</i>	99	AM284971
Grupo 25	UFLA 01-751	879	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	FN543677
Grupo 26	UFLA 01-785	1058	<i>Burkholderia nodosa</i>	98	AM284971
	UFLA 01-789	1048	<i>Bacillus</i> sp.	100	HM566884
	UFLA 01-791	1220	<i>Bacillus</i> sp.	97	GQ340502
	UFLA 01-781	982	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543721
Grupo 27	UFLA 01-790	913	<i>Bacillus subtilis</i>	100	CP006881
Grupo 28	UFLA 01-780	1106	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CP006881
Grupo 29	UFLA 01-793	1085	<i>Bacillus subtilis</i>	99	CP006881
Grupo 30	UFLA 04-445	1106	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546
Grupo 31	UFLA 04-269	839	<i>Burkholderia</i> sp. (de Carvalho, 2010)	99	EU219864

O alinhamento do nucleotídeo foi construído pelo Clustal W (Thompson et al., 1994), utilizando-se o método Neighbour-Joining com o Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980) pelo programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013), e as análises de *bootstrap* foram realizadas com um mínimo de 1.000 replicações.

De acordo a análise da sequência do gene 16S rRNA, pode-se verificar a formação de dois clusters, em que, no primeiro, 13 estirpes foram determinadas como pertencentes ao gênero de *Burkholderia*, com alta similaridade com as estirpes *Burkholderia* sp. FN543720, *B. nodosa* AY773192, *Burkholderia* sp. FN543721, *B. rhynchosiae* EU219864 e as estirpes testadas no presente estudo quanto à eficiência simbiótica na fixação biológica do nitrogênio e identificadas como *Burkholderia* sp. por de Carvalho (2010), embora a estirpe UFLA 01-759 tenha apresentado alta similaridade com a bactéria *Stenotrophomonas* sp. KF216559. As demais estirpes que compuseram o segundo cluster apresentaram alta similaridade com as bactérias *Paenibacillus* sp. JX566548, *Brevibacillus* sp. FJ719331, *Brevibacillus nitrificans* AB507254, *Lysinibacillus sphaericus* JQ744621, *Bacillus megaterium* HF584899 e *Bacillus subtilis* EF423592 (Figura 11).

As 13 estirpes que apresentaram alta similaridade com espécies de *Burkholderia* corresponderam aos resultados obtidos por de Carvalho (2010), a qual realizou a separação dos grupos bacterianos pela caracterização cultural. Entretanto, as demais estirpes foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* e *Bacillus*, o que demonstra que a caracterização cultural pode subestimar a diversidade genética bacteriana.

Dentre as 13 estirpes identificadas como *Burkholderia*, as estirpes UFLA 01-795, UFLA 01-802, UFLA 04-274, UFLA01-794, UFLA01-757 e UFLA 04-442 apresentaram 100% de similaridade com as estirpes de *Burkholderia*, UFLA 04-260, UFLA 01-751, UFLA 01-748, UFLA 01-739 e UFLA 01-731 e UFLA 01-756, identificadas por de Carvalho (2010), e

*Burkholderia* sp. FN543720, sequência depositada no GenBank. Como já relatado, as estirpes UFLA 01-744 e UFLA 01-731 apresentaram capacidade de nodulação em *M. bimucronata*, bem como as estirpes UFLA 04-260, UFLA 01-751, UFLA 01-748, UFLA 1-739 e UFLA 01-756 foram nodulíferas em *M. bimucronata* e *M. foliolosa* (Figura 11).

A estirpe UFLA 01-732, nodulífera em *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, apresentou 100% de similaridade com a sequência depositada no GenBank referente à *B. nodosa* AY773192, e as estirpes UFLA 01-785 e UFLA 01-786 apresentaram alta similaridade com as estirpes UFLA 01-733 e UFLA 01-753, nodulíferas em *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, e a estirpe UFLA 04-248 que, além de nodular as espécies leguminosas arbóreas em estudo, nodulou o siratro (Figura 11).

As estirpes UFLA 01-725, UFLA 01-692, UFLA 01-728 e UFLA 01-781 apresentaram alta similaridade com as estirpes UFLA 01-750, nodulífera em *M. bimucronata*; UFLA 01-726, nodulífera em *M. bimucronata*, *M. foliolosa* e siratro, bem como com a estirpe UFLA 04-405, nodulífera em *M. bimucronata* e *M. foliolosa* e a *Burkholderia* sp. FN543721, sequência depositada no GenBank (Figura 11).

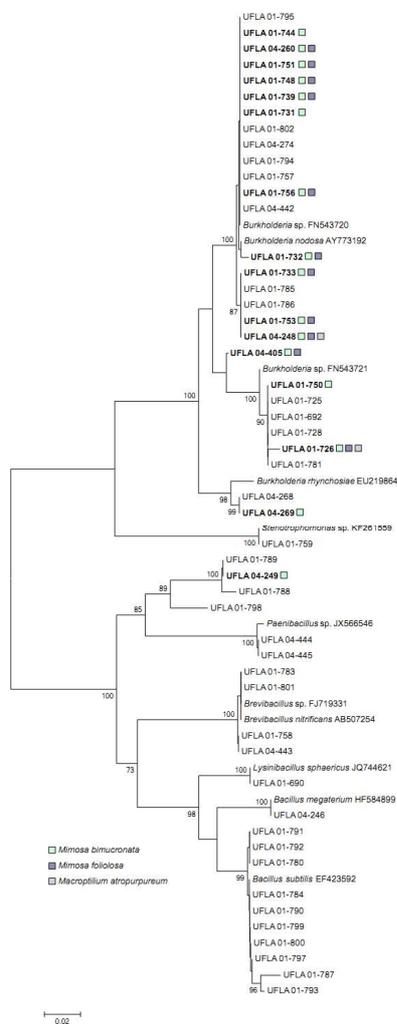


Figura 11 Relação filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA de estirpes isoladas de nódulos de *Macroptilium atropurpureum* (siratiro) e *Mimosa tenuiflora* (de Carvalho, 2010) e testada a eficiência simbiótica em *M. bimucronata*, *M. foliolosa* e siratiro. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o método Neighbour-Joining, pelo programa MEGA 6, aplicando-se *bootstrap* com um mínimo de 1.000 replicações

## 4 DISCUSSÃO

### **Nodulação e eficiência simbiótica das estirpes de *Burkholderia* em *Macropodium atropurpureum***

Das 15 estirpes pertencentes ao gênero de *Burkholderia* em estudo, apenas UFLA 01-726 e UFLA 04-248 foram capazes de nodular *Macropodium atropurpureum*, entretanto, não foram eficazes, pois as plantas foram relativamente pequenas, com folhas amareladas, indicativos de deficiência de nitrogênio (Figura 1).

A capacidade de espécies de *Burkholderia* em estabelecer simbiose com *Macropodium atropurpureum* foi constatada, pela primeira vez, por Moulin et al. (2001), que obtiveram os mesmos resultados para eficiência simbiótica na fixação biológica de nitrogênio. Barret; Parket (2005), ao testarem a nodulação de 51 estirpes isoladas de leguminosas Mimosoideae, sendo 44 pertencentes ao gênero *Burkholderia*, relataram que todos os genótipos formaram nódulos em *M. atropurpureum* ou *Mimosa pigra*, mas não foram eficazes na fixação biológica de nitrogênio em *M. atropurpureum*, obtendo resultados semelhantes ao deste estudo.

Entretanto, Elliot et al. (2007) constataram que a estirpe *B. tuberum* STM678 tipo selvagem, as estirpes *B. tuberum* STM678 gfp e *B. tuberum* STM678 (psD32) (estirpes geneticamente modificadas), e a estirpe *B. tuberum* DUS833 conseguiram nodular e ser eficientes a *M. atropurpureum*, porém, a atividade da nitrogenase de *M. atropurpureum* pelas estirpes de *B. tuberum* foi altamente variável, o que comprova certa instabilidade da relação simbiótica entre o gênero *Burkholderia* e a espécie vegetal *M. atropurpureum*.

A espécie *M. atropurpureum* é considerada uma hospedeira promíscua, por ser capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio que

nodulam leguminosas, tanto as pertencentes à subclasse da  $\alpha$ -proteobactéria, como da  $\beta$ -proteobactéria. Como é verificado na literatura, a capacidade de bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Bromfield; Barran, 1990; Trinick; Miller; Hadobas, 1991), *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Azorhizobium* (Florentino et al., 2009; Gonçalves; Moreira, 2004; Moreira et al., 2006), *Burkholderia* (Elliot et al., 2007; Angus et al., 2013) e *Cupriavidus* (Florentino et al., 2009; Silva et al., 2012) de nodular e apresentar eficiência simbiótica quando associadas a *M. atropurpureum*.

Lima et al. (2009) constataram que o siratro é uma planta eficiente para capturar diversas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas, em diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica e que, em condições controladas de casa de vegetação, as estirpes apresentaram diferentes níveis de eficiência, podendo ser utilizadas para melhorar a fixação biológica de nitrogênio em agrossistemas gerenciados.

#### **Nodulação e eficiência simbiótica das estirpes de *Burkholderia* em *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa***

As estirpes de *Burkholderia* em estudo apresentaram maior capacidade de estabelecer simbiose com plantas pertencentes ao gênero *Mimosa*, uma vez que todas as estirpes em estudo foram capazes de nodular a espécie *M. bimucronata* e as estirpes UFLA 01-726, UFLA 04-260, UFLA 01-753, UFLA 04-405, UFLA 01-748, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-732, UFLA 04-248, UFLA 01-751 e UFLA 01-756 nodularam *M. foliolosa*. O contrário ocorreu com os resultados obtidos em *M. atropurpureum*, em que todas as estirpes testadas foram ineficientes na fixação biológica do nitrogênio e na promoção do crescimento vegetal e apenas as estirpes UFLA 01-726 e UFLA 04-248

apresentaram a capacidade de induzir a formação de nódulos nas raízes da mesma.

No presente estudo foi verificada eficiência simbiótica na fixação biológica de nitrogênio das estirpes de *Burkholderia* nodulíferas, UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405 em *M. bimucronata*, por apresentarem resultados estatisticamente significativos em relação à matéria seca da parte aérea e nos demais parâmetros avaliados.

Dentre as estirpes que apresentaram resultados representativos quanto ao diâmetro do coletado, UFLA 01-731, UFLA 01-753 e UFLA 01-756 foram identificadas, por de Carvalho (2010), como *Burkholderia nodosa*, com 99% de similaridade, quando comparadas com as sequências encontradas no Genbank. Tal espécie bacteriana foi descrita, por Chen et al. (2007), como uma nova espécie bacteriana capaz de nodular e fixar nitrogênio em *Mimosa scabrella* e *M. bimucronata*.

As estirpes de *Burkholderia* testadas não apresentaram resultados significativos na produção de matéria seca da parte aérea das mudas de *M. foliolosa*. Entretanto, foi constatada a presença de nódulos ativos em suas raízes e o mesmo foi verificado nos nódulos formados nas raízes de *M. bimucronata* (Figura 12: dado demonstrado com a espécie de *M. foliolosa*), o que comprova a presença da leg-hemoglobina nos nódulos e demonstra sua atividade na fixação biológica de nitrogênio.



Figura 12 Presença de nódulos com o interior vermelho, após 70 dias da inoculação das estirpes de *Burkholderia* nas raízes de *Mimosa foliolosa*

O presente estudo corrobora as pesquisas desenvolvidas até o momento, na comprovação da hipótese da existência da especificidade de estirpes de *Burkholderia* com o gênero *Mimosa*, como as realizadas por Vandamme et al. (2002), Chen et al. (2006), Chen et al. (2007), Barret; Parker, (2005), Chen et al. (2008), Bontemps et al. (2010), Reis et al. (2010), Mishra et al. (2011) e de Oliveira-Cunha et al. (2012), nos quais novas espécies de *Burkholderia* sp. foram descritas, tais como *B. caribenis* (Vandamme et al., 2002), *B. mimosarum* (Chen et al., 2006), *B. nodosa* (Chen et al., 2007), *B. sabiae* (Chen et al., 2008) e *B. phenoliruptrix* (de Oliveira-Cunha et al., 2012).

No entanto, Elliot et al. (2007) verificaram que, ao contrário das outras espécies de *Burkholderia* até agora descritas por Vandamme et al. (2002), Chen et al. (2006; 2007; 2008), Barret; Parker, (2005), Mishra et al. (2011) e de Oliveira-Cunha et al. (2012), a estirpe *Burkholderia tuberum* STM678 não conseguiu nodular três espécies da família mimosoideae (*Mimosa pigra*, *M. diplotricha* e *M. pudica*), provavelmente por apresentar sequências de genes de nodulação diferentes das espécies de *Burkholderia* descritas e que estabelecem

simbiose com *Mimosa* spp. Como afirmaram por Gyaneshwar et al. (2011), os genes de nodulação e fixação biológica de nitrogênio, respectivamente, *nodA* e *nifH*, de *B. tuberum* STM678<sup>T</sup>, são relativamente distantes, em comparação com os genes provenientes da estirpe *Burkholderia phymatum* STM815<sup>T</sup>.

Dentre as especificações de estirpes nodulíferas em espécies de leguminosas arbóreas, a estirpe BR 3460 e a BR 3461 são conhecidas por demonstrarem capacidade de nodulação, atividade de nitrogenase, presença de genes essenciais e responsáveis pela nodulação e eficiência na fixação biológica do nitrogênio em *M. bimucronata* (Faria et al., 1997; Chen et al., 2005; Chen et al., 2007).

No experimento com *M. bimucronata*, os tratamentos com as estirpes UFLA 01-732, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 01-753, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 04-249 e BR-3460 se destacaram de forma significativa em relação a número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea, altura e diâmetro do coletado, o que demonstra a correlação dos dados de forma positiva. Este mesmo tipo de correlação entre os dados foi observado em estudos realizados por Lima et al. (2005), ao analisarem eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* de solos da Amazônia.

Em relação à quantidade de nódulos e matéria seca de nódulos, no ensaio experimental com *Mimosa bimucronata*, as estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-744, UFLA 04-260 e UFLA 04-269 induziram a formação de menor quantidade de nódulos nas raízes das mudas, entretanto, apresentaram matéria seca de nódulos equivalentes à dos demais tratamentos.

Neste estudo, a *Mimosa foliolosa* estabeleceu simbiose com 12 estirpes de *Burkholderia*, sendo estas capazes de nodular, e os tratamentos com as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-748, UFLA 04-248 e UFLA 01-750, que apresentaram valores significativos quanto à produção de nódulos e à matéria

seca de nódulos, o que demonstra correlação positiva entre os parâmetros avaliados. Como retratado por Soares et al. (2006), a relação peso e tamanho dos nódulos são atributos determinados pela população bacteriana e a eficiência da mesma durante o processo de simbiose.

Diversas pesquisas retratam a produção de matéria seca total, matéria seca de parte aérea e raízes como boas variáveis para a avaliação da qualidade de mudas de espécies florestais (Bernardino et al., 2005; Sousa et al., 2013). Assim, a relação altura/diâmetro do colo constitui um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade de mudas florestais, por mensurar o acúmulo de reservas e assegurar maior resistência e melhor fixação da planta no solo (Sturion; Antunes, 2000).

Segundo Moreira; Moreira (1996), mudas que apresentam diâmetro do colo pequeno e alturas elevadas são consideradas de qualidade inferior à das mudas menores e com maior diâmetro do colo, sendo a relação altura/diâmetro do colo uma variável que pode determinar a capacidade de sobrevivência de mudas no campo. Entretanto, neste estudo foi observado que as mudas nas quais houve a inoculação das estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739 e UFLA 01-748 obtiveram resultados significativos em relação aos tratamentos inoculados com as demais estirpes avaliadas, quanto à altura, ao diâmetro, à matéria seca total e à matéria seca da raiz em *M. foliolosa*.

Para o índice de qualidade de Dickson, os tratamentos UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 01-751, UFLA 04-260 e UFLA 01-750 apresentaram resultados significativos em relação aos tratamentos com as demais estirpes testadas e ao tratamento com concentração mínima de N mineral, e inferior ao tratamento com N mineral.

A *M. foliolosa* é uma espécie endêmica de campo rupestre da Serra do Cipó, em Minas Gerais (Barneby, 1985; Giulietti et al., 1997), e adaptada a ambientes hostis, com baixa fertilidade do solo e escassez de água (Whelan,

1995, Ribeiro; Fernandes, 2000, Negreiros et al., 2011), o que justifica os valores obtidos no tratamento com pequena quantidade de N mineral nos parâmetros avaliados, tais como altura, diâmetro do coletado, matéria seca total e da parte aérea. Por sua vez, esta espécie vegetal é pioneira em estudos de nodulação e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio e nodulíferas em leguminosas.

De forma geral, as estirpes de *Burkholderia* em estudo apresentaram capacidade de estabelecer simbiose com as espécies de *M. bimucronata* e *M. foliolosa*, atuando na promoção do crescimento vegetal, apresentando potencial para aplicação biotecnológica, de maneira a serem utilizadas como inoculantes em mudas de leguminosas florestais, pertencentes ao gênero *Mimosa*.

### **Identificação das estirpes**

As estirpes foram identificadas, de 98% a 100%, como pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Stenotrophomonas*, por meio da comparação das sequências obtidas com as depositadas no GenBank.

As estirpes UFLA 01-802, UFLA 01-794, UFLA 01-725, UFLA 01-728, UFLA 04-442, UFLA 01-795, UFLA 01-692, UFLA 04-268, UFLA 04-274, UFLA 01-786, UFLA 01-757, UFLA 01-785 e UFLA 01-781 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Dentre estas, as estirpes UFLA 01-802, UFLA 04-442, UFLA 01-786, UFLA 01-757 e UFLA 01-785 foram identificadas como *Burkholderia nodosa*, respectivamente, com 99% e 98% de similaridade, quando comparadas com as sequências encontradas no GenBank.

As estirpes identificadas, no presente estudo, como *Burkholderia* sp. apresentaram alta similaridade com as estirpes de *Burkholderia* identificadas por

de Carvalho (2010) e testadas quanto à capacidade de nodulação e à eficiência simbiótica em *M. bimucronata*, *M. foliolosa* e *M. atroporpureum* (Figura 11). Estas, por sua vez, podem apresentar alto potencial biotecnológico, relacionado à fixação biológica de nitrogênio e à promoção do crescimento vegetal de leguminosas, conforme relatado por Chen et al. (2007), ao descreverem, pela primeira vez, uma nova espécie bacteriana, chamada de *B. nodosa*, capaz de nodular e fixar nitrogênio em *Mimosa scabrella* e *M. bimucronata*.

Tais resultados estão correlacionados com as estirpes previamente identificadas como *Burkholderia* spp. (UFLA 01-731, UFLA 01-726, UFLA 04-260, UFLA 01-753, UFLA 01-750, UFLA 04-405, UFLA 01-748, UFLA 01-744, UFLA 04-249, UFLA 01-733, UFLA 01-739, UFLA 01-732, UFLA 01-756, UFLA 04-248, UFLA 01-751, UFLA 04-269) e utilizadas como representantes dos diferentes grupos culturais corroboram o agrupamento das bactérias em estudos realizados por de Carvalho (2010). Carvalho (2010) utilizou no seu estudo, o tempo de crescimento, a mudança de pH do meio de cultivo, as características morfológicas da colônia, a produção de muco e a absorção de indicador do meio de cultivo como parâmetros para o agrupamento das estirpes. Entretanto, as estirpes UFLA 01-783, UFLA 01-800, UFLA 01-797, UFLA 04-443, UFLA 01-788, UFLA 01-787, UFLA 01-758, UFLA 01-799, UFLA 01-759, UFLA 01-784, UFLA 04-444, UFLA 04-246, UFLA 01-690, UFLA 01-792, UFLA 01-798, UFLA 01-801, UFLA 01-789, UFLA 01-791, UFLA 01-790, UFLA 01-780, UFLA 01-793 e UFLA 04-445 foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Stenotrophomana*, *Paenibacillus* e *Lysibacillus*, mesmo contendo características culturais semelhantes à das estirpes de *Burkholderia*, tais como tempo de crescimento rápido, acidificação e alcalinização do meio de cultivo e absorção do indicador de pH. Dessa forma, pode-se verificar que as características

culturais utilizadas por de Carvalho (2010) como parâmetros para a realização do agrupamento subestimaram a diversidade genética das estirpes em estudo.

Na literatura é constatada a junção de diferentes técnicas moleculares e tradicionais para a caracterização e a identificação de diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, tais como os gêneros *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Allorhizobium* (Lajudie et al., 1998), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Blastobacter* (Berkum; Eardly, 2002) e *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005).

Segundo Moreira et al. (2006), os gêneros de rizóbios podem ser diferenciados pelas características culturais e morfológicas em meio de cultivo 79, como verificaram Guimarães et al. (2012), segundo os quais estirpes de crescimento lento alcalinizantes foram predominantemente identificadas como *Bradyrhizobium* spp., com 100% de similaridade, ao serem submetidas ao sequenciamento do 16S rRNA e comparadas com as estirpes tipo das espécies depositadas no banco de dados GenBank.

Entretanto, em diversos trabalhos tem sido relatado o isolamento de bactérias não simbióticas, tais como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, em nódulos desinfestados (Kan et al., 2007; Li et al., 2008; Shiraishi et al., 2010; Jaramillo, 2010; Marra et al., 2012), e com características culturais e morfológicas semelhantes à dos gêneros de rizóbios de crescimento rápido, como é retratado no presente estudo.

O mesmo foi constatado por Costa et al. (2013), ao identificarem estirpes nodulíferas de feijão-caupi como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, tendo as estirpes dos

gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* atuado na promoção do crescimento vegetal da cultura em estudo por outros mecanismos não relacionados à fixação biológica de nitrogênio, tais como produção de auxina e solubilização de fosfato.

As principais limitações para o isolamento do endófito se devem à anatomia dos nódulos, que se originam do periciclo, o que dificulta a remoção de contaminantes endofíticos, uma vez que o tecido vascular é interno aos tecidos colonizados e permite o crescimento rápido de contaminantes em meios de cultivos considerados não seletivos (Moreira et al., 2006). Tais bactérias são denominadas oportunistas e, possivelmente, penetram no tecido vegetal, juntamente com as nodulíferas, durante a infecção e a formação de nódulos (Kan et al., 2007).

Dessa forma, pode-se verificar, neste estudo, que estas bactérias oportunistas apresentam características culturais e fenotípicas semelhantes às da *Burkholderia* spp, bactérias nodulíferas de crescimento rápido, o que torna ineficiente a utilização desses parâmetros para o agrupamento de bactérias em nível de gênero. Assim, o sequenciamento do gene 16S rRNA foi uma técnica eficiente para detectar a diversidade e identificar, quanto ao gênero, as bactérias avaliadas no presente estudo.

## 5 CONCLUSÃO

As estirpes UFLA 01-726 e UFLA 04-248, pertencentes ao gênero *Burkholderia*, são capazes de nodular *Macropodium atropurpureum*, entretanto, são ineficientes quanto à fixação biológica de nitrogênio e na promoção de crescimento vegetal.

As estirpes de *Burkholderia* testadas estabelecem simbiose, com excelente capacidade de nodulação em *Mimosa bimucronata*, bem como as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750 e UFLA 01-751 em *Mimosa foliolosa*.

As estirpes UFLA 01-731, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-249, UFLA 04-260 e UFLA 04-405, e as estirpes UFLA 01-726, UFLA 01-739, UFLA 01-748, UFLA 04-248, UFLA 04-260, UFLA 01-750 e UFLA 01-751 promovem o crescimento vegetal pela fixação biológica de nitrogênio em *Mimosa bimucronata* e em *Mimosa foliolosa*.

Treze estirpes (37,1%) pertencem ao gênero *Burkholderia* e correspondem às características morfológicas e culturais de estirpes do gênero *Burkholderia*, ditas representante grupos culturais realizado por de Carvalho (2010).

Cinco estirpes identificadas como *Burkholderia nodosa* podem atuar de forma representativa na promoção de crescimento vegetal em leguminosas do gênero *Mimosa*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. D. A.; MAEDA, J. A.; FALIVENE, S. M. P. Efeitos de métodos de escarificação na germinação de sementes de cinco leguminosas forrageiras. **Revista Científica do Instituto Agrônomo**, v. 38(9), p. 83-96, 1979.

ANGUS, A. A.; LEE, A.; LUM, M. R. L.; HIRSCH, A. M. SHEHAYEB, M.; HESSABI, R.; FUJISHIGE, N.; YERRAPRAGADA, S.; KANO, S.; SONG, N.; YANG, P.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; FARIA, S. M.; DAKORA, F. D.; WEINSTOCK, G.; HIRSH, A. M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macropitilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant soil**, 2013.

BARNEBY, R. C. The genus mimosa (mimosaceae) in Bahia, Brazil: New taxa and nomenclatural adjustments. **New York Botanical Garden**, Bronx, p. 125-153, 1985.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 57-65, 2005.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. In Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.

BERKUN, P. van; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.

BERNARDINO, D. C. S. et al., Crescimento e qualidade de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan em resposta à saturação por bases do substrato. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.863-870, 2005.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; DE FÁTIMA, M. L.; DE FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Mol Ecol**, v. 19, p. 44-52, 2010.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 369-372, 1990.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.

CHEN, W. M.; LAEVEN, S.; LEE, T.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M.; MOULIN, L. BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **J Bacteriol**, v. 185, p. 7266-7272, 2003.

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

CHEN, W.-M. ; VANDAMME, P. ; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J.-H.; BARRIOS, E. ; DE FARIA, S. M. ; ELLIOTT, G. N. ; SHEU, S.-Y. ; SPRENT, J. I. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. From Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.1847-1851, 2006.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

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

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Washington, v.5, n.9, p.719-729, 2003.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; de CARVALHO, F.; TROCHMANNA, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Plant growth promotion and genetic diversity of bacteria isolated from cowpea nodules. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1988.

DICKSON, A.; LEAF, A.L.; HOSNER, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forest Chronicle*, v. 36, p.10-13, 1960.

de CARVALHO, F. Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiontes radiculares em campos rupestres da serra do cipó, MG. Tese de doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

de OLIVEIRA-CUNHA, C.; GODA-ZULETA, L. F.; DE ALMEIDA, L. G. P.; PRIOLI-CIAPINA, L.; BORGES, W. L.; PITARD, R. M.; BALDANI, J. I.; STRALIOTTO, R.; DE FARIA S. M.; HUNGRIA, M.; SOUSA-CAVADA, B.; MARTINIS-MERCANTE, F.; DE RIBEIRO VASCONCELOS, A. T. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa flocculosa*. **J Bacteriol**, 2012.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W.G.; BONTEMPS, C.; CHOU, J-H. ; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I. JAMES, E. K. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, Exeter, v. 100, n. 7, p. 1403-1411, 2007.

FARIA, S. M et al. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais. **Recomendação Técnica – Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**, n. 1, 1-4, 1997.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A program for statistical analysis and teaching. **Rev Symp**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Laboratory manual of general microbiology. New York: McGraw-Hill Book, 143 p., 1928.

FLORENTINO, L. A. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbiont of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W-M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. GROSS, E.; REIS, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, P. W.; JAMES, E. K. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. **The American Phytopathological Society**, v. 24, p. 1276-1288, 2011.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R. M. Espinhaço Range region, Eastern Brazil. In: Davis, S. D. et al., (eds), *Centres of Plant Diversity* 3, pp. 397-404. **Information Press**, Oxford, 1997.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. And its nodule isolates *Azorhizobium jonhannae* with other Legume Host and Rhizobia. **I Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A. N.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B. S. MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology**. Volume 78, p. 6726–6733, 2012.

HOAGLAND, D. A.; ARNON, D. D. The water-culture method for growing 39 plants without soil. *Calif. Agric. Expt. Sta. Cir*, 347, 1950.

JARAMILLO, P. M. Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob Agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca. Dissertação. Universidade Federal de Lavras, p. 81, Lavras, 2010.

JARVIS, B. D. W. et al., Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 895-898, 1997.

JORDAN, D. C. *Bradyrhizobium*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 242-244, 1984.

KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 103–115, 2007.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, v.16, p.111–120, 1980.

LAJUDIE, P, et al. Allorhizobium undicola sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, p. 1272-1290, 1998.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHENA, W. F.; CHENA, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.238–246, 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, 2009.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M. de; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J.M. de; MOREIRA, F.M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, p.289–307, 2012.

MISHRA, R. P. N.; TISSEYRE, P.; MELKONIAN, R.; CHAINTREUIL, C.; MICHÉ, L.; KLONOWSKA, A.; GONZALEZ, S.; BENA, G.; LAGUERRE, G.; MOULIN, L. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of Burkholderia phymatum and other beta-rhizobia. **Microbiol Ecol**, v. 79, p. 487–503, 2011.

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

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, F. W. Característica de germinação de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazônica**, v. 26, n. 1/2, p. 3-16, 1996.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. **2. ed. Lavras: UFLA**, 729p., 2006.

NEGREIROS, D.; FERNANDES, G. W.; BERBARA, R. L. L.; RODARTE, L. H. O.; BARBOSA, N. P. U. Caracterização físico-química de solos quartzíticos degradados e áreas adjacentes de campo rupestre na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Neotrop Biol Conserv**, v. 6, p. 156 –161, 2011.

NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H.V.; SIMON, R.; SELBITSHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology*, v. 82, p. 477-484, 1997.

OLIVEIRA, S. M.; L. M. MARRA, L. M.; MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 948-959, 2013.

ONOFRE-LEMUS, J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; GIRARD, L.; CABALLERO-MELLADO, J. ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 20, 2009.

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

RIBAS, L. L. F.; FOSSATI, L. C.; NOGUEIRA, A. C. SUPERACÃO DA DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze (MARICÁ). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, p. 98-101, 1996.

RIBEIRO, K.T.; FERNANDES, G. W. Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. **Plant Ecol**, v. 147, p. 205 –218, 2000.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLENS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. D.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Nov. 2002.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p. 269–274, 2010.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; SOUZA MOREIRA, F. M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Syst Appl Microbiol**, v. 35, p. 175-82, 2012.

SILVEIRA, F. A. O.; FERNANDES, G. W. Effect of light, temperature and scarification on the germination of *Mimosa foliolosa* (Leguminosae) seeds. **Seed Sciences & Technology**, v. 34, p. 585-592, 2006.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG) II– feijoeiro. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 30, p. 803-811, 2006.

SOARES, P. L. Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] e sua identificação. Dissertação apresentada ao programa de Ciências do solo. Universidade Federal de Lavras, 2009.

SOUSA, W. C. E. ; NÓBREGA, R. S. A. e ABRAHÃO, R. S; NÓBREGA, JÚLIO CÉSAR AZEVEDO ; BRITO, D.R.S. ; MOREIRA, F. M. S. Fontes de nitrogênio e caule decomposto de *Mauritia flexuosa* na nodulação e crescimento de *Enterolobium contortsiliquum*. **Revista Árvore**, v. 37, p. 969-979, 2013.

STURION; J.A.; ANTUNES, B.M.A. Produção de mudas de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M. Reflorestamento de propriedades rurais para fins de produtivos e ambientais, Colombo, p.125-150, 2000.

SY, A, et al. Methylophilic *Methylobacterium* nodulate and fix-nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

TALBI, C.; DELGADO, M. J.; GIRARD, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E. J. *Burkholderia phymatum* Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4587-4591, 2010.

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

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**, v. 22, p. 4673-80, 1994.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A. Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, 1991.

TRUJILLO, M. E. WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VALVERDE, A. et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, v. 55, p. 1985-1989, 2005.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T., HOSTE, B.; COOPMAN, R. Occurrence of mul-tiple genomovars of *Burkholderia cepacia* cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, p. 1188–1200, 1997.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp nov and *Burkholderia phymatum* sp nov nodulate the roots of tropical legumes. **Syst Appl Microbiol**, v. 25, p. 507-512, 2002.

VINCENT, J. M. A manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria International Biological Programme Handbook, 15, Blackwell Scientific, Oxford, 1970 .

WHELAN, R. J. The ecology of fire. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 346, 1995.