

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

**Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica**

**Alice de Sousa Cassetari**

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

**Piracicaba  
2010**

**Alice de Sousa Cassetari  
Engenheira Agrônoma**

**Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica**

Orientador:  
Prof. Dr. **MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS**

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

**Piracicaba  
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cassetari, Alice de Sousa  
Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica / Alice de Sousa  
Cassetari. - - Piracicaba, 2010.  
98 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Biodiversidade 3. Diversidade genética 4. Fixação c  
nitrogênio 5. Leguminosae 6. Mata Atlântica 7. Nodulação 8. RNA ribossômico I. Título

CDD 631.847  
C344d

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



*DEDICO*

*À MEU QUERIDO E INESQUECÍVEL IRMÃO IN MEMORIAN*

*OFEREÇO*

*Aos meus pais Daniel e Marlene, pelo amor e apoio em todos os momentos.*

*A minha irmã Luciana pelo imenso carinho e companheirismo*

*AMO MUITO TODOS VOCÊS!*



## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter permitido que eu chegasse aonde cheguei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais, pela confiança, paciência pelos inúmeros ensinamentos e por me dar o privilégio de fazer parte da sua equipe.

À Capes pela bolsa concedida.

Ao meu pai Daniel por ter sido mais do que um exemplo de pai, amigo e professor, exemplo de força de vontade, de muita luta e de inúmeras vitórias.

A minha mãe Marlene pelo carinho, por toda força que me deu e por ter acreditado que eu conseguiria.

A minha irmã Luciana, minha eterna companheira, pela amizade, pela paciência nos momentos difíceis, pela ajuda e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular dos programas de Solos e Nutrição de Planta e de Microbiologia Agrícola Adriano, Bolinha, Eder, Elisa, Gisele, Giselle (uai), Joze, Kelly, Mar, Rafael, Sandra, Winston, Silvia e Vivian pela amizade, pelos momentos bons que serão sempre lembrados e pelos momentos ruins que trouxeram maturidade, pelas incontáveis ajudas nos trabalhos, companheirismo e inúmeros ensinamentos.

Aos amigos que fiz em Piracicaba que vou levar pela vida inteira, eternos “membros da equipe” Bruna, João, Layanne, Renê, Nara, Mylenne, Fabi e André.

As amigas de república Janaína e Wioleene pela companhia e por tornar o meu mestrado mais alegre.

Aos técnicos de laboratório Denise, Fernando e Wladimir pela ajuda na execução do trabalho e pela amizade.

Aos amigos do projeto temático BIOTA/FAPESP, em especial Ewerton e Pesão pela imensa ajuda durante as coletas, companheirismo, amizade e por contribuírem diretamente para realização desse trabalho.

Ao programa de Solos e Nutrição de Plantas e Microbiologia, aos funcionários do departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP, em especial ao Prof. Dr. Pablo Vidal Torrado pela compreensão diante das dificuldades.

A toda minha família e amigos, que mesmo distantes sempre me apoiaram.

**MUITO OBRIDAGA A TODOS!!!**





## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo Geral .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>19</b>
3.1 Revisão Bibliográfica .....	19
3.1.1 Mata Atlântica.....	19
3.1.2 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico.....	21
3.1.3 Processo de formação dos nódulos em leguminosas .....	24
3.1.4 Estudo de diazotróficos nodulíferos em florestas tropicais.....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 Descrições das áreas de estudo .....	29
4.2 Amostragem.....	31
4.3 Isolamento de bactérias dos nódulos .....	33
4.4 Caracterização cultural dos isolados .....	33
4.5 Extração de DNA bacteriano .....	34
4.6 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR.....	34
4.7 Amplificação de fragmentos do gene do rRNA 16S .....	35
4.8 Sequenciamento do gene rRNA 16S .....	36
4.9 Análise das sequências do gene rRNA 16S.....	36
4.10 Amplificação de fragmentos do gene <i>nifH</i> .....	37
4.11 Determinação da capacidade nodulífera e eficiência simbiótica dos isolados .....	38
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1 Distribuição sazonal dos nódulos .....	41
5.2 Isolamento e caracterização cultural dos isolados .....	47
5.3 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR.....	51
5.4 Diversidade genética dos isolados de bactérias.....	57
5.5 Detecção da presença do gene <i>nifH</i> .....	66

5.6 Análise da capacidade de nodulação e eficiência simbiótica.....	67
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## RESUMO

### Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas na Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um importante bioma da costa brasileira, apresenta grande diversidade de plantas e animais, porém, pouco se sabe sobre a diversidade microbiana. Da mesma forma, pouco se sabe sobre o papel funcional desses microrganismos. Vários microrganismos estão envolvidos na ciclagem do nitrogênio na Mata Atlântica, e dentre eles os diazotróficos são de particular interesse, pois contribuem para o aporte direto de nitrogênio nos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas em duas parcelas permanentes do Parque Estadual da Serra do Mar em diferentes altitudes. Nódulos de raízes foram coletados nas quatro estações do ano. As bactérias foram isoladas do interior dos nódulos, resultando em 105 isolados. A análise de diversidade genética destas bactérias foi feita utilizando-se BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A capacidade de nodulação dos isolados foi determinada através da formação de nódulos em caupi (*Vigna unguiculata*). Os resultados indicaram que há uma diferença na distribuição espacial e temporal dos nódulos nas áreas estudadas. A maior quantidade de nódulos foi encontrada na parcela de Picinguaba, em estações com menores índices pluviométricos. Os isolados apresentaram uma grande diversidade fenotípica, sendo separados em 6 grupos com características culturais semelhantes. Os perfis de BOX-PCR formaram 8 grupos genotípicos com mais de 80% de similaridade, agrupando tanto isolados de Picinguaba quanto de Santa Virgínia. Os perfis dos géis do BOX-PCR apresentaram variação no número e mobilidade das bandas. Os dados foram transformados em uma matriz binária de presença e ausência que possibilitou a análise de agrupamento hierárquicos com 8 grupos genotípicos com mais de 80% de similaridade, agrupando tanto isolados de Picinguaba quanto de Santa Virgínia. Através do sequenciamento parcial de fragmentos de gene rRNA 16S verificou-se que a estrutura das comunidades diazotróficas de Picinguaba e Santa Virgínia não apresentaram diferença estatisticamente significativa, indicando que não há seleção de populações bacterianas específicas nas áreas. Dos isolados testados, 88% apresentaram capacidade de nodular caupi, porém alguns não foram eficientes em promover o crescimento das plantas. Nas duas áreas predominou UTOs filogeneticamente associados ao gênero *Paenibacillus* nos nódulos, sugerindo que essas bactérias são importantes para nodulação de leguminosas na Mata Atlântica.

Palavras-chave: Mata Atlântica; Fixação biológica de nitrogênio; Biodiversidade; rRNA 16S; *nifH*



## ABSTRACT

### Diversity of nodulating diazotrophs of the Atlantic Rainforest

The Atlantic Rainforest is a major biome of the Brazilian coast, which harbors great diversity of flora and fauna, but little is known about its microbial diversity. Furthermore, little is known about the functional role of these abundant microorganisms. Several microorganisms are involved in cycling of the Atlantic Rainforest's nitrogen, among them the diazotrophs which are of particular interest because they contribute to the direct input of nitrogen to ecosystems. The aim of this study was to evaluate the diversity of legumes nodulating diazotrophs in two permanent plots of the Serra do Mar State Park at different altitudes. Root nodules were collected throughout the four seasons. The bacteria were isolated from inside of the nodules, resulting in 105 isolates. The analysis of genetic diversity was performed using BOX-PCR and rRNA 16S sequencing. The nodulation capacity of the isolates was determined by the nodule formation in cowpea (*Vigna unguiculata*). The results indicated that there are spatial and temporal differences distribution in the areas studied. The largest number of nodules was found in the Picinguaba plot during seasons of low rainfall. The isolates showed a wide phenotypic diversity, hence divided into six groups with similar cultural characteristics. The BOX-PCR profiles formed eight genotypic groups with more than 80% similarity, when comparing the isolates from Picinguaba those from Santa Virginia. The BOX-PCR gel profiles showed variation in number and mobility of bands. The data was transformed into a binary matrix of presence and absence that allowed the hierarchical cluster analysis of eight genotypic groups with more than 80% similarity, again comparing both isolates Picinguaba and Santa Virginia. Through partial sequencing of 16S rRNA gene fragments no statistically significant difference was found between the diazotrophs community structures of Picinguaba the and that of Santa Virginia, indicating no selection for specific bacterial populations in these areas. In both isolates tested, 88% showed cowpea nodulating capacity, but some were not effective in promoting plant growth. In both areas OTUs phylogenetically associated with nodule of genus *Paenibacillus* predominated, suggesting that these bacteria are important for legume nodulation in the Atlantic Rainforest.

Keywords: Atlantic Rainforest; Biological Nitrogen Fixation; Biodiversity; rRNA 16S; *nifH*



## 1 INTRODUÇÃO

Originalmente localizada em todo o litoral brasileiro, a Mata Atlântica ocupava uma área de 1,3 milhão de quilômetros quadrados. É a segunda maior floresta tropical do Brasil. Hoje encontra-se apenas 7,3% de sua extensão conservada (IBAMA, 2007). A principal característica desta floresta é a heterogeneidade dos extratos arbóreos constituídos de árvores de médio a alto porte, formando uma floresta densa e fechada, com uma alta umidade e muito sombreada. Outra característica marcante é a alta diversidade de espécies de animais e plantas. As florestas tropicais úmidas, conhecidas como Florestas Ombrófilas, apresentam um importante papel na manutenção da ciclagem de carbono e nitrogênio, e com isso desempenham um papel fundamental na manutenção da biodiversidade (CLARK et al., 1995). Apesar do conhecimento da diversidade de espécies animais e vegetais encontradas na Mata Atlântica, pouco se sabe a respeito dos microrganismos presentes no solo e quais suas funções nos diferentes ecossistemas. Os microrganismos do solo podem estar envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes, incluindo carbono e nitrogênio.

Com uma área de 315 mil ha, o Parque Estadual da Serra do Mar é uma região montanhosa que abrange uma área que percorre todo o litoral brasileiro da divisa do Estado de São Paulo com o Rio de Janeiro, até Itariri, envolvendo quinze municípios metropolitanos de São Paulo e da Baixada Santista (INSTITUTO FLORESTAL - IFLORESTAL, 2009). Grande riqueza e diversidade de espécies tornam este Parque Estadual uma importante área de preservação, sendo uma das maiores áreas de remanescentes contínuos de Mata Atlântica. Nela são encontrados alguns núcleos de estudo, entre eles o Núcleo de Picinguaba e de Santa Virgínia, com áreas de florestas tropicais de restinga e florestas densas, submontana e montana, com grande variação altitudinal. Muito embora uma grande quantidade de estudos tenham sido conduzidos em diferentes áreas deste parque, as informações sobre ecologia microbiana, em especial de bactérias diazotróficas, são muito limitadas.

Microrganismos diazotróficos, podem viver livremente no solo e em sistemas aquáticos, ou em associação com plantas, animais, protozoários e fungos. No caso das plantas, os diazotróficos podem ser encontrados na rizosfera de várias espécies,

endofiticamente associados a algumas espécies ou estabelecendo simbioses mutualísticas com leguminosas. Seu principal papel é reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera para amônia ( $\text{NH}_3$ ), a qual pode ser assimilada por plantas e microrganismos. Este processo constitui o principal aporte de nitrogênio nos ecossistemas (MARIN et al., 1999). Porém, como na maioria dos casos, o suprimento de nitrogênio na solução do solo é insuficiente para o crescimento vegetal, é possível encontrarmos plantas com sintomas de deficiência de nitrogênio nas florestas tropicais (LASTE et al., 2007).

Estima-se que cerca de 139 milhões toneladas de nitrogênio ao ano sejam fixados biologicamente em ambientes terrestres enquanto a fixação industrial representa cerca de 49 milhões toneladas de nitrogênio ao ano (BURNS; HARDY, 1975). Na soja, a simbiose com rizóbios já substituiu completamente o uso de fertilizantes nitrogenados, que em 2006, gerou uma economia de US\$3,3 bilhões considerando-se uma área cultivada aproximadamente 21 milhões de hectares (MOREIRA et al., 2010). Por isso o Brasil é considerado o país que mais aproveita os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2007).

A simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) com leguminosas é de grande importância, principalmente em espécies arbóreas as quais podem ser utilizadas para diversos fins como a recuperação de áreas degradadas, por exemplo, e contribuir com uma alternativa para incrementar o aporte de nitrogênio nos ecossistemas, além de colaborar para a redução do efeito estufa e reduzir a perda de nitrogênio por lixiviação (KENNEDY et al., 2004).

A diversidade de bactérias diazotróficas associadas às espécies vegetais na Mata Atlântica é pouco conhecida, mas pode ter um papel funcional essencial para a manutenção da sustentabilidade dos seus ecossistemas.

Levantamentos realizados no projeto “Gradiente Funcional” do programa Biota da FAPESP nos Núcleos de estudo de Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, indicam diferenças significativas na disponibilidade de N nos solos em diferentes altitudes, sugerindo funcionamento diferenciado quanto ao ciclo de nitrogênio e funcionamento do ecossistema como um todo (JOLY et al., 2008). Os levantamentos fitossociológicos realizados nas áreas indicam a ocorrência de um número considerável



de espécies arbóreas da família Leguminosae. Entretanto, estas não apresentaram grande valor de importância nas diferentes fisionomias, sugerindo pequena contribuição para a FBN total do ecossistema. Foram identificadas 132 espécies da família Leguminosae ao longo do gradiente altitudinal (72 espécies da subfamília Papilionoideae, 42 de Mimosoideae e 18 de Caesalpinioideae), sendo em sua maioria, espécies de hábitos não arbóreos (lianas, ervas e arbustos). As bactérias que induzem a formação de nódulos, bem como sua capacidade em fixar  $N_2$  nessas plantas são praticamente desconhecidas.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas em duas parcelas permanentes do Parque Estadual da Serra do Mar, fundamentando-se na hipótese de que a maior diversidade genética das bactérias fixadoras de nitrogênio está relacionada com fatores do solo, com a quantidade de espécies de leguminosas e com o maior aporte de nitrogênio no ecossistema.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas em duas parcelas permanentes do Parque Estadual da Serra do Mar a fim de estabelecer uma relação entre a ocorrência de diferentes grupos de bactérias e as condições do ambiente.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar a ocorrência e abundância sazonal de nódulos nas raízes de espécies de leguminosas no Parque Estadual da Serra do Mar em diferentes altitudes;
- ✓ Caracterizar as bactérias isoladas do interior dos nódulos de leguminosas;
- ✓ Avaliar a diversidade genética de bactérias diazotróficas nodulíferas isoladas do interior dos nódulos de leguminosas através de análises de fragmentos específicos de DNA genômico e sequenciamento parcial do gene rRNA 16S.



### **3 DESENVOLVIMENTO**

#### **3.1 Revisão Bibliográfica**

##### **3.1.1 Mata Atlântica**

A Mata Atlântica é uma floresta tropical úmida com uma altíssima biodiversidade, ocupando boa parte do litoral brasileiro, com uma extensão de aproximadamente de 1,3 milhões de quilômetros quadrados. Seu clima é equatorial ao norte e quente temperado sempre úmido ao sul e com temperaturas médias elevadas durante o ano. A alta pluviosidade nessa região deve-se à barreira que a Serra do Mar constitui para os ventos que sopram do mar. Seu solo é pobre e a topografia é bastante acidentada. No interior da mata, devido à densidade da vegetação, a luz é reduzida. Em função das diferentes altitudes encontradas nesse ambiente, a variação de clima, umidade, pluviosidade, luz e oxigênio são significativas, dependendo da parcela estudada (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2007). Variações na temperatura associadas com a altitude estão fortemente correlacionadas com estrutura de comunidades de espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa (OLIVEIRA-FILHO; FONTES 2000, LACERDA, 2001, SCUDELLER et al., 2001).

Apesar da baixa fertilidade, normalmente observa-se em solo sob floresta uma grande decomposição do material orgânico, baixas perdas de nutrientes por lixiviação e grande ciclagem de nutrientes, mesmo em grandes altitudes (SILVA et al., 2007a). De forma geral, os solos da Mata Atlântica são pobres e pouco intemperizados com uma grande camada de serapilheira, formada devido à abundante vegetação. Além disso, esses solos contêm altas concentrações de substâncias húmicas e abundantes populações de microrganismos heterotróficos envolvidos ciclagem de nutrientes (SOS MATA ATLÂNTICA, 2008).

Uma das grandes dificuldades encontradas nos parques e reservas ecológicas da Mata Atlântica é o seu crescente isolamento de outras áreas naturais, protegidas ou não. Por esse motivo, e como a conservação da biodiversidade requer não somente a

preservação em nível de espécie, mas também a diversidade genética contida em diferentes populações é essencial proteger múltiplas populações de uma mesma espécie (metapopulações). Além disso, é importante lembrar que populações isoladas são mais vulneráveis a eventos demográficos e ambientais aleatórios, tornando-as mais susceptíveis à extinção local, regional ou mesmo completa (AYRES et al.,2005).

Segundo a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, (VELOSO et al.,1991) a Floresta Ombrófila Densa pode ser dividida em quatro classificações, de acordo com as diferentes altitudes. Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, com altitude de 5 a 50 metros em relação ao nível médio do mar, Floresta Ombrófila Densa Submontana, com altitude variando de 50 a 500 metros, Floresta Ombrófila Densa Montana, de 500 a 1.200 metros e Floresta Ombrófila Densa Altimontana, acima de 1.200 metros. Essa classificação é de grande importância e está relacionado com a disponibilidade de nitrogênio e fósforo no solo. No geral, N e P são menos abundantes em maiores altitudes, principalmente devido à menor quantidade de serapilheira produzida (TANNER et al., 1998).

No Parque Estadual da Serra do Mar encontra-se o núcleo de estudos Picinguaba (23°34' S e 45°02' W), que abrange uma área de 47 mil ha, localizado inteiramente no município de Ubatuba, próximo à divisa com o estado do Rio de Janeiro. As precipitações anuais são elevadas, resultantes dos efeitos orográficos da Serra do Mar. A temperatura média anual do ar é de 16,5 °C, com 10 °C no inverno e 22 °C no verão. A umidade relativa média mensal do ar está entre 80 a 85% para a estação chuvosa, e inferior a 80% para o restante do ano. Caracteriza a área a ocorrência frequente de nevoeiros densos nos períodos crepuscular e noturno (ARCOVA, 1996). A vegetação consiste de uma cobertura natural secundária, sucessora da vegetação natural primária conhecida como Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), a qual foi removida pela exploração madeireira há aproximadamente 45 anos (LEITÃO FILHO, 1982). O núcleo existente, Núcleo de Santa Virgínia (23°17' S e 45°11' W), consiste de uma área de 9 mil ha, a qual preserva grande quantidade de nascentes e flora diversificada (IFLORESTAL, 2009), e vegetação variando desde restinga até Floresta Ombrófila Densa sedimentada.

No Parque Estadual da Serra do Mar são encontradas diversas famílias botânicas. A biodiversidade para a Floresta Ombrófila Densa, denominada em seu conjunto, Mata Atlântica, é de aproximadamente 20 mil espécies de plantas das quais mais de 8 mil são endêmicas (MYERS et al., 2000). A família das leguminosas se destaca por ser uma das mais ricas em espécies e variedades, sendo a segunda maior família das dicotiledôneas. Dentre as leguminosas podemos encontrar *Tachigali denudata*, *Swartzia simplex*, *Dahlstedtia pinnata*, *Abarema lusoria*, *Inga edulis*, *Pterocarpus rohrii* e *Sclerolobium denudatum* em maior abundância e maior frequência nas diferentes altitudes do Parque Estadual da Serra do Mar. Tem sido reportado que essas espécies formam simbioses com bactérias fixadoras de nitrogênio, com formação de nódulos nas raízes (BARBERI et al., 1998; GROSSMAN et al., 2005).

A grande diversidade de espécies de leguminosas que nodulam pode se refletir em uma grande diversidade de bactérias, porém em florestas estes relatos são escassos. Tiwary et al. (2007) relataram a caracterização e o grande potencial biofertilizante de rizóbios isolados de leguminosas em florestas na Índia. Já um inventário realizado na região Amazônica revelou a ocorrência de nódulos em 25% das *Caesalpinioideae*, 88% das *Mimosoideae* e 84% das *Papilionoideae*, dentre as espécies examinadas em cada subfamília. Das 137 espécies de leguminosas com nódulos nas raízes, 32, incluindo três *Caesalpinioideae*, 19 *Mimosoideae* e 10 *Papilionoideae* são novos registros (FARIA et al., 2010).

### **3.1.2 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico**

O nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva e o que mais pode influenciar no desenvolvimento de uma planta. É comum encontrar em solos brasileiros, inclusive em florestas tropicais uma baixa disponibilidade de nitrogênio, acarretando em baixo desenvolvimento vegetal. No entanto, alguns microrganismos são capazes de converter enzimaticamente o nitrogênio atmosférico em amônio, de forma simbiótica ou assimbiótica (DOBEREINER, 1997).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é considerado o processo mais importante relacionado com a manutenção da vida na Terra e o principal processo

microbiano relacionado com a produção agrícola. A contribuição dos microrganismos no aporte de nitrogênio em diversos ecossistemas é de extrema relevância.

Algumas gramíneas de interesse econômico como trigo, milho e arroz podem se associar a bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* (LODEWYCKX et al., 2002). A cana-de-açúcar também é uma cultura que pode se associar com espécies diazotróficas como, por exemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989) e *Herbaspirillum* spp. (GYANESHWAR et al., 2001). Zehr et al. (1996) descreveu através da caracterização do gene *nifH*, a capacidade de diversos microrganismos marinhos em fixar nitrogênio, principalmente aqueles agregados a cianobactérias *Trichodesmium*,

O processo químico de redução do nitrogênio atmosférico requer um gasto de energia elevado, e utiliza alta pressão e temperatura para o rompimento da ligação tripla covalente entre os dois átomos de N. Industrialmente, a redução do nitrogênio à amônia consome energia derivada de fontes não renováveis, como o petróleo (SPRENT & SPRENT, 1990). Em microrganismos diazotróficos, o complexo enzimático nitrogenase, é capaz de promover essa mesma reação à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia proveniente de processos foto ou quimiossintéticos ou obtida a partir do metabolismo de carboidratos (fermentação ou respiração) na forma de ATP (ZEHR et al., 2003).

Estima-se um aporte global de cerca de 139 milhões mg N/ano nos diferentes ecossistemas através da fixação biológica de nitrogênio, em contraste com cerca de 49 milhões mg N/ano através de fertilizantes químicos (BURNS & HARDY, 1975). Além da fixação biológica do nitrogênio, outros efeitos benéficos são associados aos diazotróficos, como a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal e controle biológico de organismos patogênicos (NERONI, 2007).

Os microrganismos diazotróficos podem ser classificados com relação ao habitat que vivem e a forma de obtenção do nitrogênio. Com isso podem ser classificados com sendo de vida livre, como *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isolados da rizosfera de cana-de-açúcar (DOBEREINER & RUSCHEL, 1958); associativos, colonizando tanto a superfície quanto o interior das raízes, como o gênero *Azospirillum* (DOBEREINER & DAY, 1975), *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE &



DOBEREINER, 1988) e *Burkholderia spp.* (YABUUCHI et al., 1992, BALDANI et al., 1997); ou simbióticos, formando nódulos nas raízes, como *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*, ou actinorizas, como *Frankia* (DREYFUS et al., 1988; DeLAJUDIE, et al., 1994; MARTINEZ-ROMERO & CABALLERO- MELLADO, 1996; JARVIS et al., 1997; DeLAJUDIE et al., 1998). Além disso, as bactérias diazotróficas podem ser classificadas como fotossintéticas (cianobacterias, *Rhodospirillum rubrum*), anaeróbicas (*Clostridium spp.*), microaeróbicas (*Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.*, *Burkholderia spp.*, etc), aeróbicas (*Azotobacter spp.* e *Derxia spp.*) (SPRENT & SPRENT, 1990).

Históricamente vários diazotróficos de vida livre têm sido amplamente utilizados como organismos modelos para investigações em laboratórios. *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* foram utilizados para o isolamento e caracterização do complexo enzimático nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995). As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* e *Anabaena* até hoje são utilizadas como organismos modelo para os estudos de genética e bioquímica da FBN (HASELKORN et al., 1985).

Os primeiros diazotróficos de vida livre identificados, *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica* foram isolados da superfície da cana-de-açúcar, (DÖBEREINER, RUSCHEL, 1958). Já entre os diazotróficos associativos destacam-se os *Azospirillum spp.* devido a sua ampla distribuição geográfica, colonizar plantas em diversos habitats (BALDANI et al., 1997).

As bactérias fixadoras de nitrogênio que são capazes de formar nódulos em associação com leguminosas são popularmente conhecidas como rizóbios, e pertencem a classe Alphaproteobacteria (ordem Rhizobiales, gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) (YOUNG, 1996). Esse grupo de bactérias é provavelmente responsável pela maior parte de fluxo de nitrogênio fixado biologicamente (KAHINDI et al., 1997). No entanto, há alguns anos, membros da classe Betaproteobacteria, como *Cupriavidus taiwanensis* (VANDAME; COENYE, 2004) foram observados em nódulos de leguminosa em solos tropicais

(VERMA et al., 2004), representando um grupo de microrganismos altamente diversificado e ainda pouco explorado.

Apesar do grande conhecimento sobre a diversidade de bactérias diazotróficas em solos cultiváveis, pouco se sabe sobre a ocorrência dessas bactérias em solos de florestas tropicais, principalmente em associação com leguminosas. Técnicas de cultivo, associadas a técnicas moleculares, como o sequenciamento completo ou parcial do gene rRNA 16S, tem sido utilizadas para estudar a diversidade de diazotróficos e estabelecer suas relações filogenética (JARVIS et al., 1992).

A filogenia de bactérias fixadoras de nitrogênio também pode ser estudada através de análises de genes funcionais. Um desses genes é o *nifH* que codifica a Fe - proteína, do complexo nitrogenase, o qual é altamente conservada em microrganismos diazotróficos (COELHO et al., 2009c), e essencial para a redução do nitrogênio (ZEHR, 2003).

Ueda et al. (2005) destacam que o gene *nifH* é um dos genes mais antigos e funcionais existentes na história da evolução genética de microrganismos. Esse gene evoluiu de forma semelhante ao gene rRNA 16S, podendo ser usado também como marcador molecular (YOUNG, 1992). Roesch et al. (2007) analisando a diversidade de bactérias diazotróficas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul, nas sequências de nucleotídeos do gene *nifH* detectaram uma grande diversidade de espécies não descritas, além de espécies conhecidas (como *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*), e observaram que a distribuição de bactérias diazotróficas pode estar relacionado com quantidade de argila do solo.

### **3.1.3 Processo de formação dos nódulos em leguminosas**

O processo de formação de nódulos em leguminosas requer o reconhecimento específico entre rizóbios e leguminosa, envolvendo complexos mecanismos de sinalização e transdução de sinais moleculares. O primeiro passo deste processo é a liberação de flavonóides pelas raízes das leguminosas as quais serão reconhecidos pelas bactérias diazotróficas e ativarão a expressão de genes *nod* específicos nas bactérias (DEBELLÉ et al., 2001). Os produtos desses genes são responsáveis pela síntese dos chamados Fatores Nod, lipoquitooligossacarídeos (LQO) essenciais para a

formação dos nódulos, e determinantes da especificidade hospedeira. Os fatores Nod são reconhecidos pela planta hospedeira através de receptores transmembrânicos específicos, resultando na curvatura dos pêlos radiculares, formação do cordão de infecção e do primórdio nodular. O reconhecimento dos fatores Nod resulta na indução da expressão de genes vegetais codificando nodulinas, proteínas nódulo - específicas essenciais para a formação dos nódulos (GOVERS et al., 1986; GLOUDEMANS & BISSELING, 1989).

Os fatores Nod nas plantas, predominantemente agem nas células epidérmicas e corticais, induzindo a despolarização da membrana plasmática, oscilação de  $Ca^{2+}$  e indução da expressão de genes específicos (EHRHARDT et al., 1992). Os mecanismos que podem afetar a troca de sinalização entre bactéria e planta ainda estão sendo investigados como condições do solo, temperaturas extremas, pH alto ou baixo no solo, pesticidas, deficiência de nutrientes entre outros (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Ao nível molecular, uma dificuldade encontrada é a identificação da expressão de genes que podem ser afetados por estes fatores.

Em *Rhizobium*, a expressão gênica necessária para o processo de nodulação é transcricionalmente silenciada quando a bactéria se encontra em meio de cultura. Isto acontece porque a expressão destes genes é regulada por ativadores transcricionais NodD, que agem apenas em conjunto com indutores das plantas (KONDOROSI, 1992). O complexo NodD interage com uma região conservada no genoma bacteriano, a região *nod boxes*. Caso essa interação não ocorra, não acontece a transcrição do produto enzimático e conseqüentemente a secreção de fatores Nod (BROUGHTON et al., 2006).

Alguns autores relatam a extrema importância do Fator Nod para a sinalização e formação do nódulo. *Medicago truncatula* normalmente é usada como planta modelo para entender este tipo de mecanismo. Pesquisas com plantas mutantes, sendo deficientes na sinalização com o Fator Nod, não apresentaram deformação dos pêlos radiculares, expressão gênica ou indução da divisão de células corticais, e conseqüentemente apresentaram ausência de nódulos na presença da bactéria (OLDROYD et al., 2003).

Além dos Fatores Nod, outras proteínas são necessárias para que ocorra todo o processo de formação dos nódulos. Algumas proteínas localizadas na superfície das células dos rizóbios são de extrema importância para que ocorra o reconhecimento das plantas hospedeiras e infecção das plantas (BROUGHTON et al., 2006).

Alguns genes identificados nas bactérias, não conservados funcionalmente ou estruturalmente, identificados como *hsn* (host-specific nod) também são essenciais para a formação dos nódulos na planta hospedeira. A importância dos genes *hsn* foi comprovada através de plantas mutantes que foram bloqueadas na expressão destes genes, e conseqüentemente também não foram capazes de induzir a formação dos nódulos (RHIJN, VANDERLEYDEN, 1995).

#### **3.1.4 Estudo de diazotróficos nodulíferos em florestas tropicais**

A simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com leguminosas é considerada uma das simbioses mais eficientes do ponto de vista evolutivo. Ao contrário do que se sabe dessa simbiose em plantas cultivadas, pouco se sabe sobre a fixação biológica de nitrogênio e bactérias diazotróficas nodulíferas colonizando espécies vegetais de florestas tropicais.

Embora não existam dados exatos sobre a quantidade de espécies de leguminosas na Mata Atlântica, acredita-se que aproximadamente 50% delas sejam endêmicas. Assim, é importante inventariar e identificar as funções desempenhadas pelos microrganismos associados a essas espécies vegetais. Da maioria das 19.000 espécies da família Leguminosae, não se tem informação sobre sua capacidade de nodular, sobretudo de espécies florestais tropicais (FARIA et al., 1999). Recentes trabalhos na Mata Atlântica e Amazônia têm contribuído com informações sobre a capacidade de nodulação de um número significativo de espécies. Atualmente 57 espécies pertencentes a 12 gêneros são formalmente descritas como capazes de nodular, mas poucas delas observadas em ecossistemas tropicais (MOREIRA et al., 2008). A principal razão da falta de estudos sobre a biodiversidade das leguminosas e suas propriedades nodulíferas, além de sua ampla distribuição na região tropical e subtropical, está na grande plasticidade dos hábitos de crescimento e nas características ecológicas das espécies. Muitos gêneros são monotípicos e somente

conhecidos de modo aprofundado pelos botânicos. Outros são restritos a áreas remotas e algumas vezes inacessíveis (SOUZA, 2010).

Levantamentos florísticos recentes em trechos de Floresta Ombrófila Densa no Parque Estadual da Serra do Mar identificaram a presença de 132 espécies de Leguminosae ao longo de um gradiente altitudinal variando de 5 a 1200 metros. Dessas, 72 espécies eram da subfamília Papilionoideae, 42 espécies de Mimosoideae e 18 espécies de Caesalpinioideae (JOLY et al., 2008). No entanto, informações sobre a presença de nódulos nessas leguminosas não existem, apesar da fixação biológica de nitrogênio ser considerado o maior aporte de nitrogênio em florestas, pouco se sabe sobre este assunto na Mata Atlântica (CLEVELAND et al., 1999). Na maioria das vezes, a ausência de nódulos nas raízes das leguminosas pode trazer dúvidas em relação à capacidade de formar simbioses com bactérias fixadoras de nitrogênio. Técnicas complementares podem ser empregadas com objetivo de qualificar e quantificar a contribuição da FBN em ecossistemas naturais tais como a técnica de redução do acetileno, balanço de N-total no sistema solo-planta, e diluição isotópica do  $^{15}\text{N}$  (RESENDE et al., 2003). Gerhing (2003) estudando o papel da fixação biológica de nitrogênio em floresta primária e secundária na Amazônia Central relatou que a contribuição das leguminosas e conseqüentemente da fixação de nitrogênio em floresta secundária é muito maior que em floresta primária, apresentando uma importância muito maior em áreas em regeneração do que em florestas clímax.

Vários estudos têm mostrado que existe um pequeno número de espécies de bactérias diazotróficas nodulíferas descritas e um grande número de espécies de leguminosas capazes de formar nódulos. Esse fato se dá na maioria das vezes devido à capacidade de algumas estirpes de rizóbio formarem simbiose com diversas leguminosas diferentes, (MOREIRA et al., 1998). Porém, espécies como *Sesbania virgata* formam simbiose com poucas espécies de bactérias, sendo altamente específicas (MOREIRA et al., 2006).

Moreira et al. (1998) realizaram um levantamento das bactérias diazotróficas nodulíferas na Floresta Amazônica, sendo que os gêneros de bactérias mais comumente encontrados foram *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, os mesmos gêneros encontrados na maioria dos solos agrícolas.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Descrições das áreas de estudo

Este estudo foi realizado no Parque Estadual da Serra do Mar, em trechos de uma Floresta Ombrófila Densa, dos núcleos de Picinguaba (23°34' S e 45°05' W) e Santa Virginia (23°17' S e 45°11' W), na região nordeste do Estado de São Paulo (Figura 1). O núcleo de Picinguaba localiza-se no município de Ubatuba, é a única porção do Parque Estadual da Serra do Mar que atinge a orla marinha (SÃO PAULO, 1996). O relevo da região é dominado pela Planície Costeira, passa pelos morros isolados e serras alongadas da Morraria Costeira, atingindo no seu limite interior as escarpas, festonadas ou com espigões digitados, da Serrania Costeira (PONÇANO et al., 1981). As altitudes no Núcleo Picinguaba variam do nível do mar a 1.340 metros. O clima regional é tropical úmido, sem estação seca (SETZER, 1966), com uma precipitação anual média superior a 2.200 mm. O núcleo de Santa Virginia situa-se no município de São Luis do Paraitinga, é recoberto predominantemente de Floresta Ombrófila Densa Montana (VELOSO et al., 1991) com altitude variando de 850 a 1200 metros. O relevo apresenta forte declividade (24° a 37°), com clima temperado, sem estação seca e precipitação média anual superior a 2.200mm.

As áreas foram previamente selecionadas com base no projeto Gradiente Funcional do programa Biota da FAPESP, coordenado por Carlos A. Joly e Luiz A. Martinelli. O projeto abrange três diferentes fitofisionomias, onde estão instaladas 12 parcelas permanentes de 1 ha cada, quatro por altitude, e todas subdivididas em 100 sub-parcelas de 10 x 10 m. Do total de parcelas em cada altitude, duas foram selecionadas para este estudo nas seguintes fitofisionomias: Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, com altitude variando de 50 a 90 m (parcela *E*) e Floresta Ombrófila Densa Montana, cujas altitudes variam de 1000 a 1100 m (parcela *M*).



Figura 1 - Localização dos Núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar

A caracterização do solo das parcelas *E* e *N* foi previamente realizada em outros trabalhos, e está apresentada na Tabela 1. Os solos são caracterizados como muito ácidos, com elevados teores de Al e baixa fertilidade, além de uma reserva nutricional restrita na camada superficial (JOLY et al., 2008). Estudos na mesma área mostraram uma maior fertilidade do solo em áreas com maior altitude (400m a 1000m), comparado com áreas mais baixas (0m a 100m) (MARTINS et al., 2010). Aproximadamente 95% do N do solo encontram-se ligado à matéria orgânica (SILVA et al., 2007).



Tabela 1 - Caracterização química dos perfis do solo das parcelas E e N. Os valores são médios de repetições (n=32)  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação em % (\*)

Prof (cm)	pH CaCl <sub>2</sub>	H+Al ....(mmolc Kg <sup>-1</sup> )....	Al	S .....(mg Kg <sup>-1</sup> ).....	P .....	SB <sup>1</sup> ...( mmolc Kg <sup>-1</sup> )...	CTC <sup>2</sup>	V <sup>3</sup> %	m <sup>4</sup>
<b>Parcela E</b>									
0-5	3,3 $\pm$ 0,1 2,9*	168,4 $\pm$ 29,0 17,2*	15,6 $\pm$ 6,7 43,1*	33,1 $\pm$ 5,1 15,5*	15,7 $\pm$ 3,2 20,6*	8,5	177,5	4,8	62,9
5-10	3,3 $\pm$ 0,1 3,5*	178,0 $\pm$ 33,2 18,7*	19,0 $\pm$ 7,7 40,8*	36,1 $\pm$ 8,9 24,6*	12,7 $\pm$ 4,2 33,3*	3,9	176,0	2,2	81,1
10-20	3,5 $\pm$ 0,1 3,2*	124,4 $\pm$ 24,0 19,3*	12,7 $\pm$ 4,1 31,9*	55,7 $\pm$ 13,0 23,3*	4,8 $\pm$ 3,4 72,6*	3,0	133,2	2,2	80,1
<b>Parcela N</b>									
0-5	3,6 $\pm$ 0,2 4,6*	128,5 $\pm$ 37,6 29,3*	24,3 $\pm$ 6,8 28,0*	19,0 $\pm$ 12,4 65,3*	16,3 $\pm$ 11,5 68,9*	12,8	141,3	9,1	65,4
5-10	3,7 $\pm$ 0,1 3,8*	99,6 $\pm$ 23,3 23,4*	21,3 $\pm$ 5,3 24,9*	25,1 $\pm$ 16,3 64,9*	10,0 $\pm$ 7,0 70,6*	5,1	104,7	4,9	80,7
10-20	3,8 $\pm$ 0,1 3,3*	83,4 $\pm$ 27,0 32,2*	17,8 $\pm$ 5,1 28,8*	34,1 $\pm$ 18,5 54,1*	6,2 $\pm$ 2,9 46,9*	4,5	87,9	5,1	79,9

<sup>1</sup> Soma de Bases; <sup>2</sup> Capacidade de troca de Cátions; <sup>3</sup> Saturação por bases; <sup>4</sup> Saturação por alumínio.

## 4.2 Amostragem

Foram realizadas quatro coletas nas diferentes estações do ano nas parcelas permanentes *E* (Picinguaba) e *N* (Santa Virgínia) do Parque Estadual da Serra do Mar. Foram adotados os mesmos procedimentos de amostragem em todas as coletas. As coletas foram realizadas em julho de 2009, outubro de 2009, janeiro de 2010 e maio de 2010.

As amostras de solo foram coletadas dos primeiros 10 centímetros de profundidade, com auxílio de um trado. Cada ponto de amostragem fazia parte de uma malha pré-estabelecida. Foi coletado um ponto por sub-parcela, sendo um total de 160 amostras de solo, separados em 50 sub-parcelas ao longo de cada parcela e mais 30 pontos aleatórios sorteados ao acaso dentro das parcelas, ilustrados de vermelho na Figura 2. De cada amostra foi realizada uma triagem para selecionar os nódulos (Figura 3). Os nódulos foram separados das raízes e conservados em sílica gel, para isolamento das bactérias.

A9	B9	C9	D9	E9	F9	G9	H9	I9	J9
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8	I8	J8
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7	I7	J7
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6	I6	J6
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5	I5	J5
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4	I4	J4
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3	J3
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2	J2
A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1
A0	B0	C0	D0	E0	F0	G0	H0	I0	J0

Figura 2 - Croqui dos pontos de amostragem nas parcelas *E* e *N* de 100 x 100m. Legendas em vermelho representam os pontos fixos de amostragem. *E1* e *I7* são pontos escolhidos ao acaso dentro das parcelas para amostragem de solo e raiz



Figura 3 - Amostragem e coleta dos nódulos

### **4.3 Isolamento de bactérias dos nódulos**

Como os nódulos estavam desidratados, o primeiro passo foi reidratá-los em água esterilizada. Para desinfestação da superfície dos nódulos, os mesmos foram imersos em álcool etílico 95%, por trinta segundos, com objetivo de quebrar a tensão superficial, e posteriormente imersos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por três minutos, para esterilizar a superfície do nódulo e, depois, lavados seis vezes em água esterilizada para a retirada do desinfestante. Os nódulos foram então esmagados com auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, e as bactérias inoculadas em meio de cultura sólido YMA (FRED; WAKSMAN, 1928, Anexo A) com azul de bromotimol como indicador de pH, distribuídos no meio de cultivo com auxílio de uma alça de platina para a obtenção de colônias isoladas. As células foram incubadas a 28°C por até 14 dias e repicadas para purificação e obtenção de colônias típicas e isoladas. Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio de cultura líquido por dois dias, homogeneizados e estocados em glicerol 20% a -80°C.

### **4.4 Caracterização cultural dos isolados**

As características culturais de todos os isolados, individualmente, foram avaliadas em placas com meio YMA, através dos seguintes parâmetros: taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido: 2 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 10 dias; muito lento: > 10 dias); diâmetro médio das colônias isoladas; modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e sem alteração), conforme Moreira (1991); forma da borda (circular, irregular, inteira, ondulada); elevação da borda (lente, convexo, plano), superfície (lisa, concêntrica), produção de muco (escassa, pouca, moderada, abundante), consistência (elástica, gomosa, butírica, aquosa), transmissão de luz (opaco, brilhante, translúcido) e coloração das colônias, conforme Jesus (2005). Os isolados foram incubados por 7 dias a 30°C, no escuro.

As bactérias foram agrupadas através do método de ligação média e distância Euclidiana, usando linha de separação em 0,87 com base nas características das colônias.

#### **4.5 Extração de DNA bacteriano**

O DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o kit FastDNA<sup>®</sup> (Q-Biogene) de acordo com as recomendações do fabricante. As bactérias foram cultivadas em meio YM líquido até a fase log. Foi transferido cerca de 300µL do meio de cultura com a bactéria para microtubos contendo granada finamente moída e 1mL da solução CLS-TC. Os tubos foram agitados horizontalmente por 40 segundos a uma velocidade de 60ms<sup>-1</sup> em um agitador FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Q-Biogene). Em seguida os microtubos foram centrifugados a 13.400 g por 5 minutos e 700µL do sobrenadante foi transferido para tubos de 2mL e adicionados mais 700µL de uma suspensão de matriz de ligação, seguido de homogeneização por inversão por 5 minutos e centrifugação por 10 segundos a 13.400 g. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500µL de solução SEWS, incubando-se por 1 minuto. A solução foi transferida para um filtro acoplado a microtubos de 2mL (Spin Filter, Q-Biogene) e os tubos centrifugados a temperatura ambiente por 1 minuto a 13.000 g. O material que passou pelo filtro foi descartado e o material retido foi lavado com 100µL de solução DES, incubando-se por 5 minutos, e centrifugando por 1 minuto a 13.400 g. O filtro foi descartado e a solução de DNA armazenada a -20°C.

A concentração de DNA foi determinada por comparação com padrão de massa em gel de agarose 1%, após colocação com SyBR-Green.

#### **4.6 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR**

A caracterização genotípica dos isolados foi feita por BOX-PCR, utilizando-se oligonucleotídeo iniciador BOX A1R descrito por Versalovic et al. (1994) (5' TCAGGCAAGGCGACGCTGACG 3'), em solução tampão de reação 5X contendo 83 mM de acetato de amônio, 335 mM de Tris-HCl, 33,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 33,5 µM de EDTA ,

150 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. A reação de amplificação foi feita em um volume final de 25  $\mu$ L contendo: 1  $\mu$ L de DNA molde, 10 pmol de oligonucleotídeo iniciador, 2,5 mM de dNTP, 10 mg/mL de BSA, 5  $\mu$ L de tampão 5X, 2,5 U de DNA polimerase *taq* (Fermentas) e 2,5  $\mu$ L de DMSO. Após desnaturação a 95°C por 5 minutos, a amplificação do DNA foi feita em 30 ciclos de desnaturação a 90°C por 30 segundos, pareamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 65°C por 5 minutos e uma extensão final a 65°C por 16 minutos.

Os produtos da BOX-PCR foram separados por eletroforese em gel de TAE-agarose 1,5 %, e visualizados utilizando-se um densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen). Para os controles positivos foram utilizados as estirpes Br10052- ATCC 14482<sup>T</sup> (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), Br29- SEMIA5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), Br322-CIAT899 (*Rhizobium tropici*, type IIB), Br111- ATCC 10324<sup>T</sup> (*Bradyrhizobium japonicum*).

Os padrões de bandas com base na mobilidade dos fragmentos de DNA do gel de todos os isolados testados foram convertidos em uma matriz binária, a qual foi utilizada para análise de agrupamento hierárquico com o programa Systat 11.0, com base no método de concordância simples ("simple matching"), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

#### **4.7 Amplificação de fragmentos do gene do rRNA 16S**

A reação de PCR para amplificação do fragmento do gene rRNA 16S foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores PRBA63f (5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A reação de amplificação continha uma mistura de 50 a 100 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U de DNA polimerase *taq*, sendo volume final de 25  $\mu$ L. As condições de amplificação foram 95° C por 5 min, 35 ciclos de 92° C por 1 min, 55° C por 1 min 72° C por 1 min, 72° C por 10 min.

Os produtos da reação de amplificação (amplicons) foram separados através de eletroforese em gel de TAE-agarose 1% e visualizados utilizando um densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA).

#### **4.8 Sequenciamento do gene rRNA 16S**

Os amplicons do gene rRNA 16S foram purificados utilizando-se o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitek, Berlin, Alemanha). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se 100ng de DNA purificado, 2,0 $\mu$ L de Dyemanic ET Terminator (GE Health Care- “General Eletrics Health Care”), 2 $\mu$ L de Tampão “Save Money” (200 mM de Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), 5pmol dos iniciadores 63f e 518r e água ultra-pura, para completar o volume para 10 $\mu$ L. Os produtos de PCR foram precipitados com isopropanol e incubados no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente. Após, os péletes foram lavados e ressuspensos com etanol 70%. O pélete foi seco no escuro por 2 horas, ressuspendido em formamida e desnaturado a 96°C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado utilizando-se um sequenciador automático ABI 3100 seguindo instruções do fabricante (Applied Biosystems)

#### **4.9 Análise das sequências do gene rRNA 16S**

As sequências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20) e sequências do vetor. Para a afiliação filogenética das sequências do gene rRNA 16S utilizou-se o programa Classifier (WANG et al., 2007), (acesso em 01 de novembro de 2010) e com base na distância evolutiva entre as sequências classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, são definidas possíveis classificações em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, uma matriz de distância evolutiva foi calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do programa PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN, 2006), a partir do alinhamento feito no

Clustal X 2.0 (LARKIN et al., 2007), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1).

Os números de UTOs e de sequências de cada UTO foram computados e utilizados para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e a recíproca do índice de Simpson, bem como para a estimativa de riqueza de UTOs pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN, 2006), pelo programa SPADE 3.1 (Species Prediction and Diversity Estimation), além da estimativa da cobertura de amostragem. As comparações entre as bibliotecas do gene rRNA 16S foram feitas utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001).

#### **4.10 Amplificação de fragmentos do gene *nifH***

Para verificar a presença do gene *nifH* no genoma dos isolados foi utilizada a metodologia descrita por Demba Diallo et al. (2004). A amplificação do *nifH* foi feita utilizando-se Nested PCR. Para a primeira reação foram utilizados os iniciadores FGPH19 (5'- TAC GGC AAR GGT GGN ATH G-3') (SIMONET et al., 1991) e POLR (5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001), gerando amplicons de 429 pb. Para a segunda reação de PCR foram utilizados os iniciadores POLF (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CTG CGA YCC SAA RGC BGA CTG-3') (POLY et al., 2001) e AQER (5'- GAC GAT GTA GAT YTC CTG-3') (POLY et al., 2001), produzindo amplicons de 320 pb. Para 25 µL de produto de PCR, as concentrações de cada reagente foram de: 50 a 100ng de DNA, 1,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de tampão 1X para PCR, 200 µM de dNTP e 1,0 U DNA polimerase taq. Para a segunda reação foram utilizados 1µL da solução de amplicons resultantes da primeira reação. As condições de PCR foram desnaturação inicial de 95°C por 1 min., pareamento de 55°C por 1 min., para a primeira reação e de 48°C para a segunda reação de PCR, extensão de 72°C por 2 min. e uma extensão final de 72°C por 7 min, repetidas 30 vezes. Após a amplificação, 4µL da solução de amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com o padrão de massa (Low DNA Mass Ladder-Invitrogen), e os amplicons visualizados por coloração com SYBR Green utilizando-se um densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA).

#### 4.11 Determinação da capacidade nodulífera e eficiência simbiótica dos isolados

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação para determinação da capacidade nodulífera dos isolados obtidos nas amostras de campo. O experimento foi conduzido usando caupi como planta isca (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar Br17 Gurgueia. O experimento foi realizado em vasos de 1,5L autoclaváveis em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ em maio de 2010. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e 44 tratamentos com os isolados selecionados a partir dos perfis gerados por BOX-PCR (descrito no item 3.7), além de 4 estirpes referências recomendadas pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) (Br10052- ATCC 14482<sup>T</sup> (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), Br29- SEMIA5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), Br322- CIAT899 (*Rhizobium tropici*, type IIB), Br111- ATCC 10324<sup>T</sup> (*Bradyrhizobium japonicum*), mais dois controles (controle com N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sem inoculação e controle sem N e sem inoculação). Os vasos foram montados com areia e vermiculita na razão 1:1, (vol:vol) e autoclavados por 2 horas, a 127°C. As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos. Em seguida elas foram lavadas 6 vezes com água destilada esterilizada. No momento da semeadura foi feita a inoculação utilizando 1mL de meio YM líquido, com as estirpes na fase log de seu crescimento. As plantas foram regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) sem N (Anexo B) e água duas vezes por semana. Uma semente pré-germinada por vaso foi plantada. As plantas foram colhidas 40 dias após a emergência, no início da fase de florescimento, para avaliação da matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, número de nódulos e eficiência relativa da fixação de nitrogênio.

A eficiência relativa foi calculada segundo a expressão:

$$Efr = \frac{MSPA_{inoculada}}{MSPA_{comN}} \times 100$$



Sendo Efr: eficiência relativa; MSPA inoculada: matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N: matéria seca da parte aérea da planta com N.

O experimento foi conduzido por 45 dias e os dados obtidos foram submetidos a análise de variância empregando-se o programa SISVAR, versão 4,0. A variável número de nódulos sofreu a transformação raiz quadrada de  $Y+1$ , para normalização dos dados.

Posteriormente, as bactérias dos nódulos foram isoladas novamente e as características culturais e genéticas foram confirmadas.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Distribuição sazonal dos nódulos

A ocorrência de nódulos nas raízes de leguminosas do Parque Estadual da Serra do Mar pôde ser observada em todas as coletas, nas mesmas sub-parcelas ou nas sub-parcelas próximas. A quantidade de nódulos encontrados variou em relação às épocas amostradas e locais amostrados. Em Santa Virgínia foram encontrados um total de 47 nódulos no inverno, 65 nódulos na primavera, 28 no verão e 98 no outono. Já em Picinguaba foram encontrados 253 nódulos no inverno, 345 nódulos na primavera, 42 no verão e 153 no outono (Figura 4). De uma maneira geral, o número de nódulos detectados na parcela permanente de Santa Virgínia foi 30% menor do que na parcela permanente de Picinguaba. A maior diferença relativa entre as duas parcelas foi observada na primavera. Nas figuras 5 e 6 estão apresentados os gráficos com os grids e as localidade onde foram amostrados os nódulos em Picinguaba e Santa Virgínia, em todas as estações do ano.

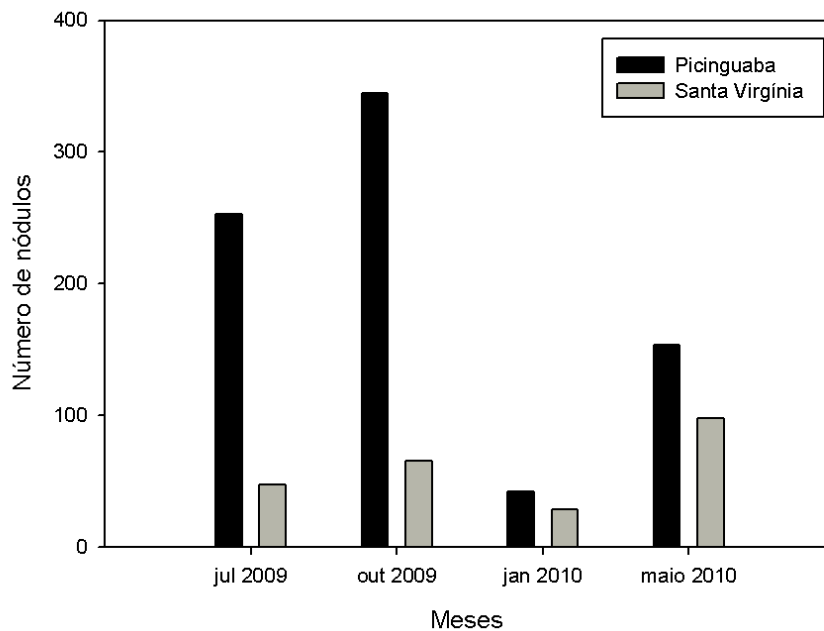


Figura 4 - Distribuição temporal e espacial dos nódulos encontrados nos Núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia

Diversos fatores bióticos e abióticos podem interferir na simbiose entre bactérias diazotróficas e plantas. O menor número de nódulos no verão pode estar relacionado com as maiores taxas de degradação da matéria orgânica da serapilheira e conseqüente aumento da quantidade de nitrogênio disponível no solo, devido às temperaturas mais elevada e maiores índices pluviométricos, em relação às demais épocas do ano. Nos meses que antecederam a amostragem realizada no inverno de 2009, primavera de 2009, verão de 2010 e outono de 2010, a média de precipitação pluviométricas foi de 16,48mm, 27,87mm, 61,83mm e 20,71mm (Figura 7) (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMOTEOROLÓGICOS - CIIAGRO, 2009). Pode-se notar que os meses de maiores índices pluviométricos foram aqueles nos quais as menores quantidade de nódulos foram detectadas. Essa tendência se manteve em todas as épocas de amostragem. Dependendo da umidade, temperatura, pH, entre outros fatores abióticos do solo, o nitrogênio pode ser mineralizado e se tornar disponível para as plantas, perdido por lixiviação ou para a atmosfera na forma gasosa (SOUZA NETO, 2008).

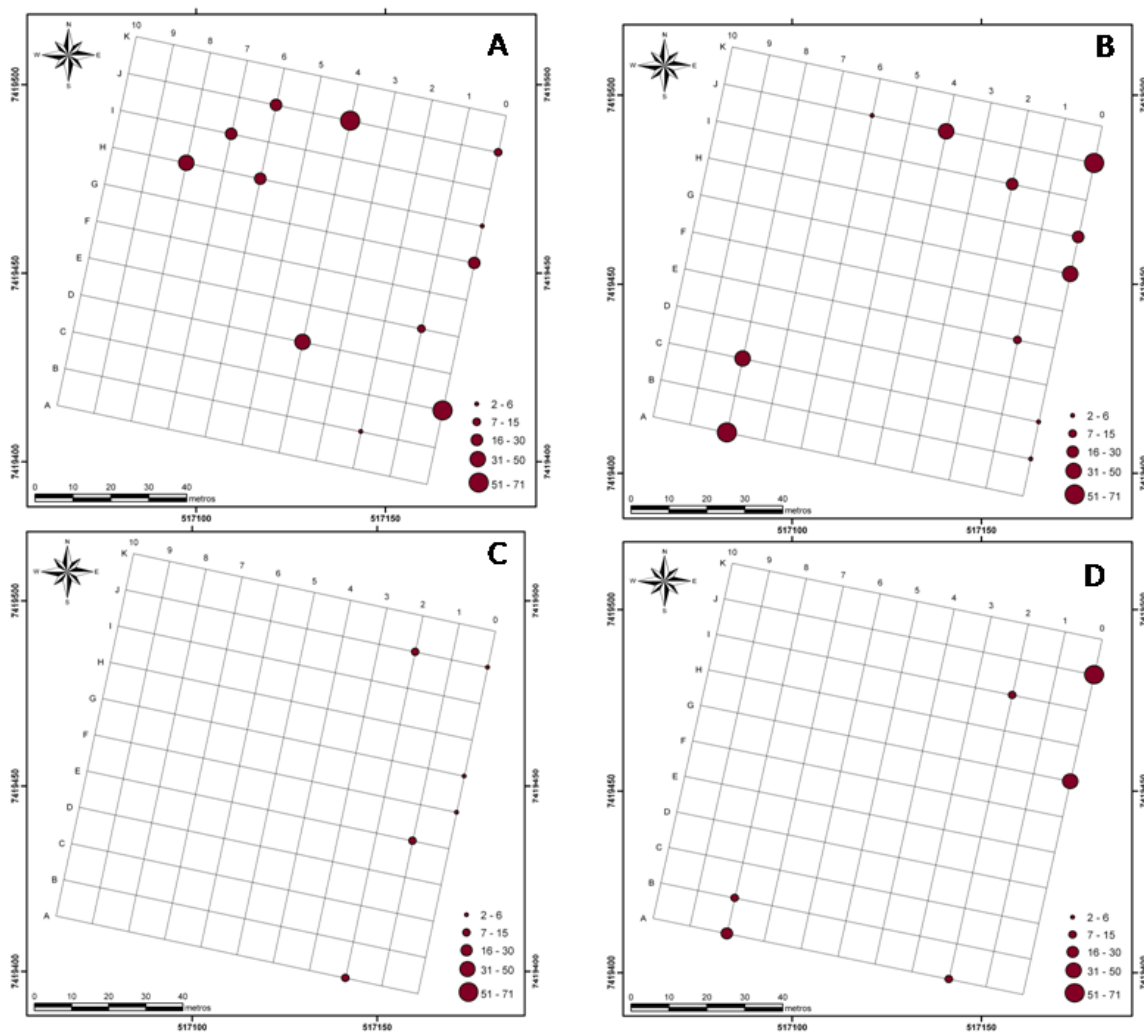


Figura 5 – Localização geográfica da parcela *E*, em Pinguaba, com os pontos onde foram encontrados nódulos de leguminosas. A, amostragem realizada no inverno, B, amostragem realizada na primavera, C, amostragem realizada no verão, D, amostragem realizada no outono

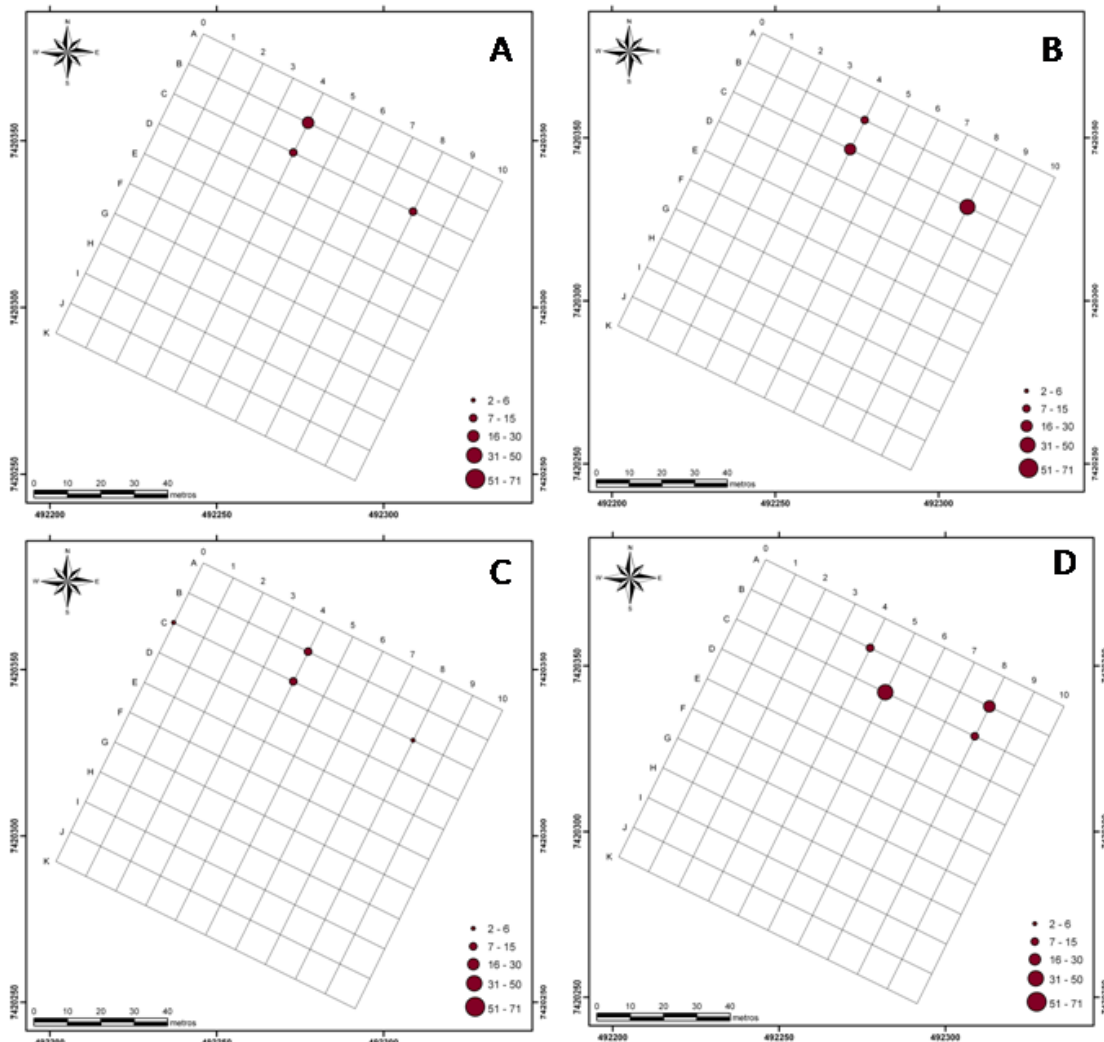


Figura 6 - Localização geográfica da parcela N, em Santa Virgínia, com os pontos onde foram encontrados nódulos de leguminosas. A, amostragem realizada no inverno, B, amostragem realizada na primavera, C, amostragem realizada no verão, D, amostragem realizada no outono

Em florestas tropicais, perdas de nutrientes por lixiviação são pequenas e a absorção de nutrientes é bastante favorecida (SILVA et al., 2007). Além disso, no verão, com a maior pluviosidade, os solos podem se encontrar em condições anaeróbicas, limitando a atividade microbiana (STRALIOTTO et al., 1999). Nóbrega (2006) também encontrou uma baixa frequência de nodulação em florestas clímax na Amazônia comparando com a frequência de nódulos encontrados em áreas de pastagens e agroflorestas de maior fertilidade.

Um fator importante a ser considerado na parcela *N*, a 1000m de altitude, os solos são mais ricos em serapilheira, com baixa fertilidade, pH menor que 4 e elevados teores de Al. A alta acidez e a toxidez de alumínio, além da baixa fertilidade, são atributos comuns de solos tropicais, e podem afetar negativamente a simbioses entre rizóbios e leguminosas (OLIVEIRA et al., 1992; CARVALHO, 1978). É provável que a menor quantidade de nódulos na parcela *N*, em todas as estações do ano, esteja associada com os atributos químicos do solo. A ocorrência de nódulos é mais favorecida por solos com maior fertilidade, ocorrendo com frequência na Mata Atlântica e na Floresta Amazônica (MOREIRA et al., 2010). A acidez do solo afeta todos os aspectos da nodulação e fixação biológica de nitrogênio, desde a sobrevivência e multiplicação dos rizóbios no solo, até o processo de infecção e desenvolvimento do nódulo e atividade da nitrogenase (GRAHAM, 1992). Da mesma forma, Jesus (2005) encontrou baixa frequência de nódulos em solos com altos teores de alumínio e baixos valores de pH na região do Alto Solimões, comparado com áreas cultivadas. Fening & Danso (2002) relataram uma menor ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio em solos com pH menores que 4,0, comparados com solos menos ácidos.

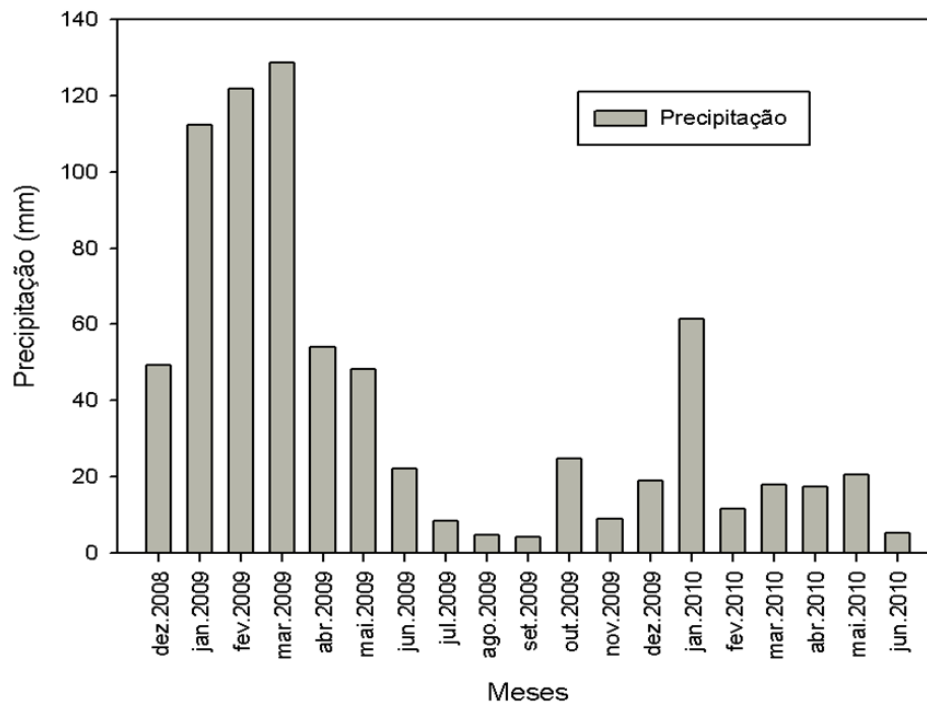


Figura 7 - Precipitação pluviométrica média mensal, entre outubro de 2008 e junho de 2010, em São Luiz do Paraitinga e Ubatuba, no Estado de São Paulo

Em um levantamento realizado por Martins (2010) foi observado que na parcela *E*, a 100m, a produção de serapilheira é maior do que na parcela de maiores altitudes, porém com menor estoque. Isto se deve a uma maior decomposição da serapilheira, levando a uma maior disponibilização de nutrientes para o solo, inclusive o nitrogênio. Porém, uma maior quantidade de nódulos foi encontrada nestas áreas, sugerindo que a ocorrência de nódulos não está somente relacionada à disponibilidade de nitrogênio e que outros fatores edáficos podem ser determinantes da nodulação de leguminosas.. Mckey (1994) defende a hipótese de que as leguminosas formam simbiose em florestas tropicais mesmo com nitrogênio disponível no solo porque além do nitrogênio fornecido, as bactérias ainda podem fornecer outros benefícios como um aumento na capacidade fotossintética e aumento na defesa contra herbivoria, compensando o custo energético da manutenção da simbiose.

Outro fator que pode ter afetado a ocorrência de nódulos nas duas parcelas amostradas foi a abundância de espécies de leguminosas em cada parcela. Foi observada uma maior abundância de indivíduos de leguminosas na parcela *E*, com aproximadamente 41 indivíduos (JOLY et al., 2008), enquanto na parcela *N* um menor número de espécies de leguminosas foi observado (dados não publicados). Uma das dificuldades encontradas durante as coletas foi a identificação da planta hospedeira, que muitas das vezes não estavam próximas ao ponto amostrado onde foram encontradas as raízes com nódulos. Em algumas das sub-parcelas uma das espécies da qual os nódulos foram isolados foi identificada como *Inga sp*. Muito embora os relatos de simbiose de rizóbios com espécies de *Inga sp* em florestas tropicais sejam escassos. Frioni et al. (2001) relatam o isolamento e caracterização de espécies de rizóbios associados a diversas espécies nativas de leguminosas arbóreas no Uruguai, incluindo o *Inga uruguensis*, a qual foi normalmente encontrada em solos ácidos, relacionados aos solos brasileiros.

Com relação a sazonalidade, trabalhos realizados por Martins (2010) na mesma área experimental relatam que a maior quantidade de serapilheira foi observada no verão. Conseqüentemente é possível que a mineralização de nitrogênio também seja maior nesta época, inibindo a nodulação formação das leguminosas. Borém et al.



(2002) demonstraram que a sazonalidade é um forte determinante da decomposição da serapilheira em florestas tropicais, o que pode explicar a variação sazonal da quantidade de nódulos.

É possível também que algumas das espécies de leguminosas da Mata Atlântica não possuam a capacidade de nodular e a abundância de nódulos não teria relação com a abundância de leguminosas. Da mesma forma, algumas sub-famílias de leguminosas possuem maior capacidade de nodular do que outras, de modo que a abundância de nódulos estaria relacionada com a estrutura da comunidade de leguminosas e não com a abundância de indivíduos ou espécies (BONETTI et al., 1984).

Poucos são os relatos de bactérias diazotróficas nodulíferas em florestas tropicais, principalmente na Mata Atlântica. Porém, estudos realizados em outros países mostram que a distribuição dessas bactérias está diretamente relacionada com algumas características químicas do solo, temperatura, e características intrínsecas das leguminosas (FRIONI et al., 2001; ODEE et al., 2002; BALA et al., 2003).

## **5.2 Isolamento e caracterização cultural dos isolados**

A partir dos nódulos encontrados, foram obtidos um total de 105 isolados por cultivo em meio apropriado. As características morfológicas dos isolados obtidos foram analisadas e usadas para agrupamento em grupos culturais (Anexo C). A identificação de cada isolado foi feita de acordo com o a parcela e sub-parcela de origem do nódulo, sendo que as primeiras letras se referem a sub-parcela em que os mesmos foram amostrados. Os isolados que apresentam SV no nome foram obtidos de nódulos provenientes de Santa Virginia, e os demais provenientes de Picinguaba.

Apesar das diversas limitações da técnica de caracterização cultural, esta técnica pode ser considerada uma boa ferramenta para a análise preliminar da diversidade de rizóbios (ZILLI et al., 2003). Em meio de cultura YMA, a maioria dos isolados obtidos dos nódulos amostrados apresentaram crescimento rápido (90%) e acidificaram o meio de cultura (82%) (Figura 8). Essa predominância de bactérias de crescimento rápido e que acidificam o meio já foi observada por Jesus et al. (2005) e Nóbrega et al. (2006).

Com relação à cor, os isolados apresentaram coloração amarelo intenso ou coloração variando de creme a branca. Melloni et al. (2006) analisando as características culturais de bactérias diazotróficas nodulíferas de caupi constaram que a maioria dos isolados bacterianos apresentaram maior similaridade com estirpes pertencentes a espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, de crescimento rápido e caráter acidificante.

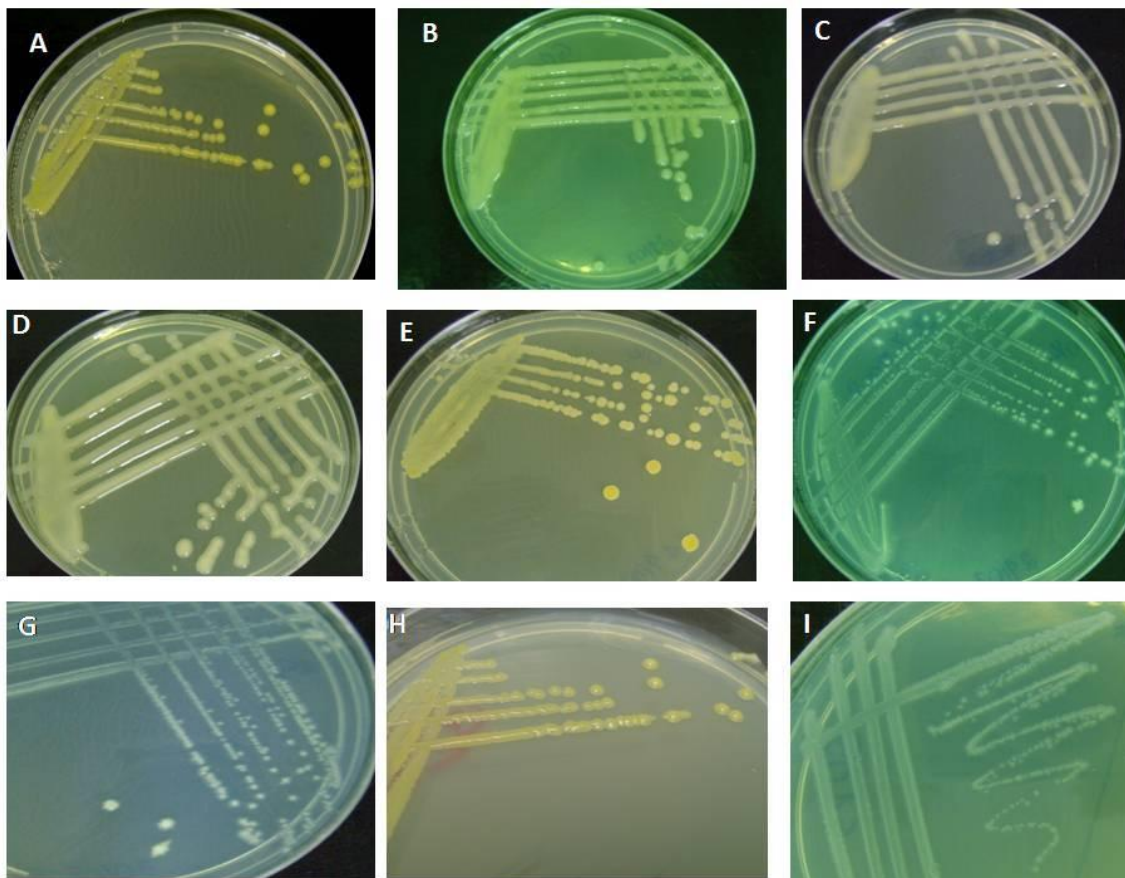


Figura 8 - Isolados de bactérias de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica em meio extrato de levedura manitol e ágar (meio YMA ou 79). A, B, D, G e H diferentes isolados oriundos de Picinguaba, C, E, F I, diferentes isolados oriundos de Santa Virginia.

As características culturais de todas as bactérias foram convertidas em uma matriz binária de presença e ausência das características e submetidas à análise de agrupamento hierárquico (Figura 9). Com base nas características culturais dos isolados e das estirpes de referência, a análise de agrupamento mostrou a formação de seis grupos considerando-se 87% (NOBREGA, 2006) de similaridade nas características culturais (Tabela 2).

O grupo I foi representado por 2 isolados provenientes de Santa Virgínia e 12 isolados de Picinguaba, além das estirpes *B. japonicum* e *B. Elkani*. O grupo II foi representado por 4 e 20 isolados de Santa Virginia e Picinguaba, respectivamente, juntamente com a estirpe *R. leguminosarum*. O grupo III foi representado por 5 isolados de Picinguaba e 1 isolado de Santa Virginia, além da estirpe *R. tropici*. o qual apresentou 100% de similaridade com os demais isolados. O grupo IV foi representado por 2 isolados oriundos Santa Virginia e 10 de Picinguaba. Já o grupo V foi representado por 1 isolado de Santa Virginia e 16 isolados de Picinguaba e o ultimo grupo foi constituído por 24 isolados sendo 21 oriundos de Picinguaba e apenas 3 de Santa Virginia.

Tabela 2- Grupos de bactérias formadas através do agrupamento das características culturais

<b>Grupos</b>	<b>Bactérias Isoladas</b>
Grupo I	G0p11, H8p9, J6p2, <b>C8SVp1</b> , G0p13, G0p1, J6p5, B2p6, E1p8B, E1p3B, <b>C4SVp3B</b> , G0p1B, G0p11B, <i>B. elkani</i> , <i>B. japonicum</i> , H6p4
Grupo II	E1p2B, C8p5A, <b>C8SVp2B</b> , <b>B4SVp3A</b> , A8p1A, A8p1B, E1p7B, C8p4A, <i>R. leguminosarum</i> , G0p2B, G0p1a, J6p3, J0p2B, J0p3B, G0p5B, G0p7B, H0p3, J4p3, G0p10B, <b>C8Svp6B</b> , G0p6, H6p5, H8p5, G0p9B , <b>B4SVp1B</b> , C8p2A
Grupo III	<b>C8SVp8B</b> , A8p2B, G0p8, J0p2, J0p1A, B8p3B, <i>R. tropici</i>
Grupo IV	E1p1B, G0pp8B, C8p2A, <b>C8Svp1B</b> C8p1A, E1p5B, A2p2B, A8p3B, G0p3B, E1p6B, B8p5B, <b>C8SVp3B</b> , J0p2
Grupo V	J4p2, G0p3, J4p6, G0p7, E1p1A, C0p1, I7p2A, B2p3, H6p1, B8p4B, J0p4A, G0p2, <b>B4SVp1</b> , J0p4B, G0p6B, G0p4B, J0p1B
Grupo VI	B2p2, H8p2, B2p5, H8p1, <b>B4SVp1A</b> , G0p10, C8p5A, A8p1B, J4p6A, J0p1, G0p5, J6p4, I7p3, <b>B4SVp2</b> J6p1, D4p2, J0p3, H6p2, <b>C8SVp5B</b> , B2p1, J4p1, D4p1, E8p3, E1p11B

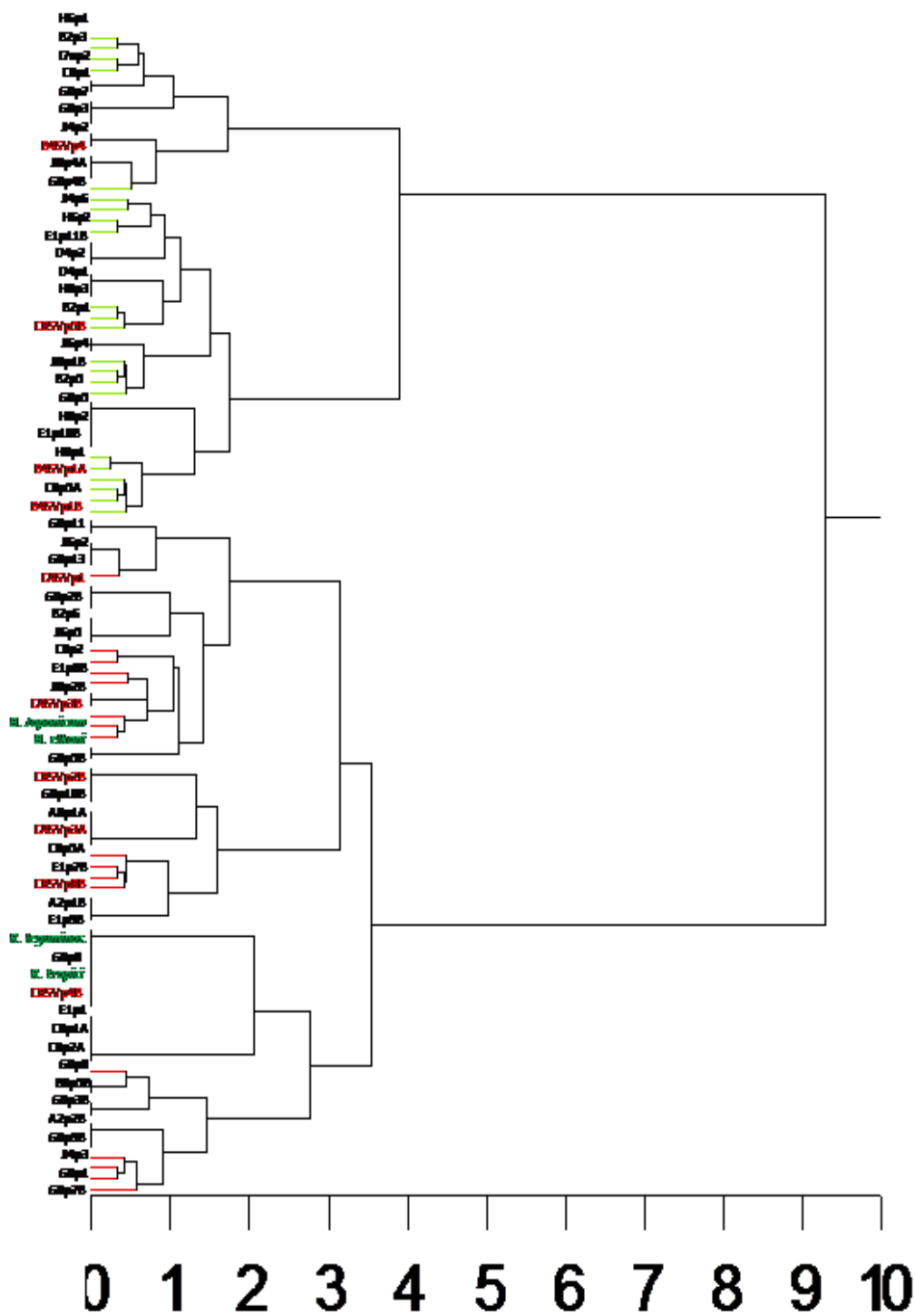


Figura 9 - Agrupamento dos isolados de bactérias diazotróficas isoladas de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica, com base em características culturais

Com base nos agrupamentos formados, pode-se observar que os morfotipos detectados ocorrem nas duas áreas amostradas, e que não houve associação de morfotipos e suas origens geográficas. Odde et al. (1997) analisaram as características culturais de isolados de bactérias nodulíferas de diferentes localidades do Quênia, e também constataram através de análises de agrupamento hierárquico que não houve associação entre os isolados e o local de origem. Esses dados sugerem que os morfotipos de diazotróficos nodulíferos são ubíquos na Mata Atlântica

### 5.3 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR

Para a caracterização genotípica dos isolados foi usado BOX-PCR para amplificação de sequências conservadas e repetidas ao longo do genoma dos isolados. Todos os isolados foram testados com relação à amplificação destas regiões, mas nem todos geraram fragmentos. Dos 105 isolados, 78 geraram produtos de amplificação. As figuras dos géis foram separadas por época do ano da qual foram coletados (Figuras 10, 11 e 12). Os perfis de bandas apresentaram de 6 a 9 bandas por isolado número ideal para uma boa análise comparativa (VERSALOVIC et al., 1994).

Os isolados caracterizados foram agrupados em 8 grupos distintos, considerando-se uma similaridade de 70% entre os perfis de amplicons do BOX-PCR (Figura 13). Apenas um dos grupos apresentou dois isolados com 100% de similaridade, os isolados C8p2A e C8p4A, ambos de Picinguaba, ambos coletados na segunda coleta, e na mesma sub-parcela, e possivelmente sejam originários da mesma planta hospedeira. Em contraste, o isolado J0p4A apresentou elevada dissimilaridade em relação a todos os outros isolados e formou um grupo isolado. O grupo I foi constituído por 12% dos isolados, sendo somente um isolado de Santa Virgínia e os demais de Picinguaba e uma estirpe de referência de *B. japonicum*. O grupo II foi constituído por 23% dos isolados, sendo 3 isolados de Santa Virgínia e 15 de Picinguaba além das estirpes *B. elkani* e *R. leguminosarum*. O grupo III foi constituído por isolados oriundos de Picinguaba representando 18% dos isolados testados. O grupo IV foi constituído da maioria dos isolados (30%), sendo que 24% foram oriundos de Santa Virgínia e 76% de Picinguaba, além da estirpe de *R. tropici*. O grupo V e VI foram

constituídos de 2 e 7 isolados, respectivamente, ambos com isolados somente de Picinguaba. O grupo VII foi constituído de dois isolados de Picinguaba, os quais apresentaram 100% de similaridade, indicando ser a mesma bactéria. Finalmente, o grupo VIII foi constituído de apenas um isolado, com alta dissimilaridade em relação aos demais isolados e estirpes referência (Tabela 3). Nenhum dos isolados apresentou o mesmo padrão de bandas das estirpes de referência, sugerindo genótipos distintos. De maneira geral, o agrupamento genotípico foi distinto daquele baseado nas características culturais dos isolados.

Os dados obtidos sugerem que existe uma grande diversidade de bactérias nos nódulos de leguminosas da Mata Atlântica e que genótipos idênticos não ocorrem em áreas geográficas distintas. Resultados contrastantes foram encontrados por Cho et al. (2000) onde para cada área amostrada, o perfil de bandas apresentou características próprias, constatando que essa técnica de tipificação por fingerprinting pode distinguir características genéticas de bactérias endêmicas.

A identificação de gêneros e espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* já foi realizada em vários estudos utilizando a técnica do BOX-PCR, indicando o grande potencial desta técnica (VINUESA et al., 1998). Em estudos realizados por Fernandes et al. (2003), foi demonstrado que a técnica de BOX-PCR pode indicar grau elevado de diversidade genética entre rizóbios, sendo um método eficiente para diferenciar estirpes. Além disso, o BOX-PCR é uma ferramenta utilizada no controle de qualidade dos inoculante atualmente recomendado para algumas espécies de leguminosas (MENNA et al., 2009), indicando que essa técnica de fingerprinting pode ser aplicada para análise genotípica de populações de bactérias diazotróficas de maneira eficiente (LAGUERRE et al., 1997; KASCHUK et al., 2006; MENNA et al., 2009).

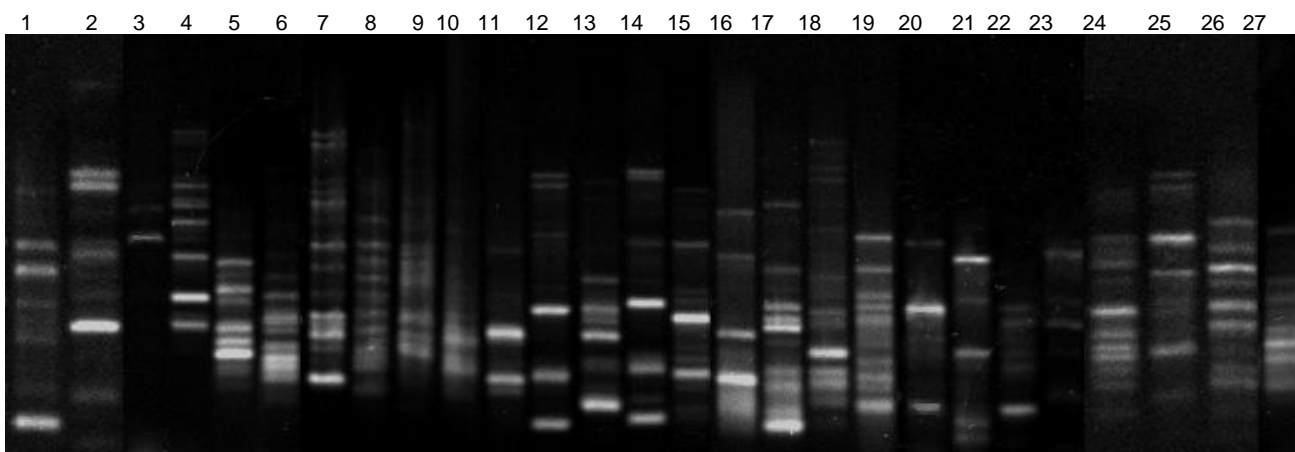


Figura 10 - Perfis de BOX-PCR dos isolados da primeira coleta, realizada no inverno de 2009. 1-G0p1, 2-G0p10, 3- B2p3, 4-D4p1, 5-J6p3, 6-H0p3, 7-J4p1, 8-J6p2, 9-G0p3, 10-G0p2, 11-J0p1, 12-H6p2, 13-C4SVp1, 14-E1p1, 15-J4p3, 16-J0p2, 17-B2p5, 18-B2p6, 19-H6p4, 20-H8p5, 21-H8p9, 22-I7p3, 23-I7p2, 24-G0p11, 25-J4p6, 26-G0p13, 27-Br322-CIAT899 (*Rhizobium tropici*, type IIB).

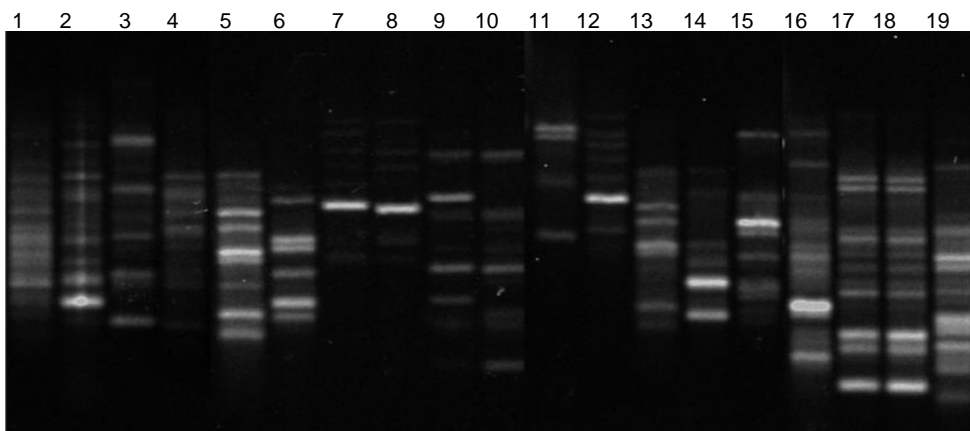


Figura 11 - Perfis de BOX-PCR dos isolados da segunda coleta, realizada na primavera de 2009. 1-C8p2A, 2-C8p3A, 3-C8p1A, 4-G0p6A 5-J0p5A, 6-J0p6A, 7-B4SVp1A, 8-C8p6A, 9-I2p4A, 10-B2p3A, 11-G0p2A, 12-G0p5A, 13-J0p4A, 14-A8p1A, 15-C8p5A, 16-C4SVp1A, 17-C8p2A, 18-C8p4A, 19-C8p7A.

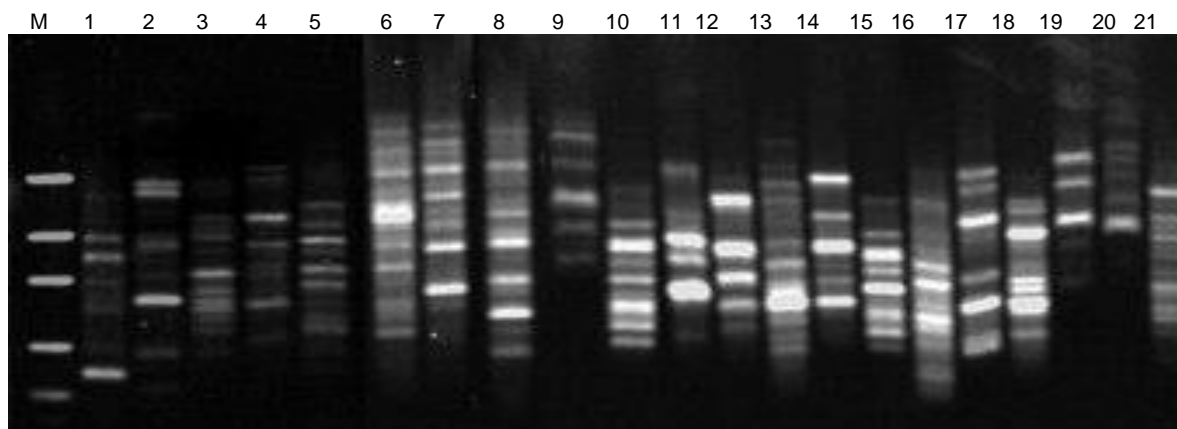


Figura 12 - Perfis de BOX-PCR dos isolados da terceira coleta, realizada no outono de 2010. M-marcador, 1-J0p4B, 2-A8p3B, 3-J0p2B, 4-E1p8B, 5-C8SVp3B, 6-C8SVp8B, 7-G0p4B, 8-G0p8B, 9-G0p10B, 10-E1p7B, 11-B8p3B, 12-J0p3B, 13-G0p7B, 14-B4SVp1B, 15-E1p2B, 16-E1p10B, 17-C8SVp4B, 18-A2p1B, 19-C8SVp2B, 20-G0p11B, 21-G0p2B.

Cottyn et al. (2009) estudando a diversidade morfológica e genética de isolados bacterianos presentes em sementes de arroz a partir de análise de perfis de amplicons obtidos por BOX-PCR e comparando os grupos de populações de bactérias formados, verificou que a frequência de populações dominantes foi baixa em todas as amostras e a maioria deles não foram partilhados em todas as amostras, indicando elevada diversidade.

Resultados similares aos do presente trabalho foram observado também por Binde et al. (2009) que relataram que mesmo isolados bacterianos pertencentes ao mesmo gênero podem gerar perfis de amplicons distintos por BOX-PCR.

Neste estudo a análise de agrupamento dos isolados mostrou pouca correlação com os locais de origem, como observado em outros relatos (MENNA et al., 2009; GERMANO et al., 2006), possivelmente devido a alta promiscuidade de rizóbios de florestas tropicais.



Tabela 3 – Agrupamento de bactérias isoladas de nódulos com base na similaridade dos perfis de amplicons gerados por BOX-PCR

<b>Grupos genotípicos</b>	<b>Bactérias isoladas</b>
Grupo I	G0p1, B2p5, E1p6B, G0p8B, B2p6B, G0p5B, G0p9B, <i>R. leguminosarum</i> , C8SVp6B,
Grupo II	C4SVp3B, C8SVp2B, H8p5, G0p2, I7p3, B8p5B, A8p1B, G0p3B, H6p4, J4p3, <i>B. japonicum</i> , <i>B. elkani</i> , G0p6B, A2p1B, B4SVp1B, B2p3, H6p2, E1p1
Grupo III	J0p1B, E1p5B, G0p3, H0p3, E1p2B, A2p2B, J6p2, E1p10b, J0p1, G0p11B, G0p1B, I7p2A, J6p3, B8p3B, G0p10B
Grupo IV	J4p1, C8p6A, B4SVp3A, C8SVp5B, G0p2A, I7p3A, <i>R. topic</i> , G0p4B, E1p7B, H8p9, B4SVp1A, J0p2, J0p3B, G0p7B C8SVp8B, B4SVp1, E1p8B, C8SVp3B, G0p10 A8p3B, G0p5A, J0p6A, A8p1A, C8SVp1B
Grupo V	C8p7A, J0p4B
Grupo VI	A8p2B, J0p5A, D4p1, C8p5A, C8p3A, C8p1A, G0p2
Grupo VII	C8p4A, C8p2A
Grupo VIII	J0p4A

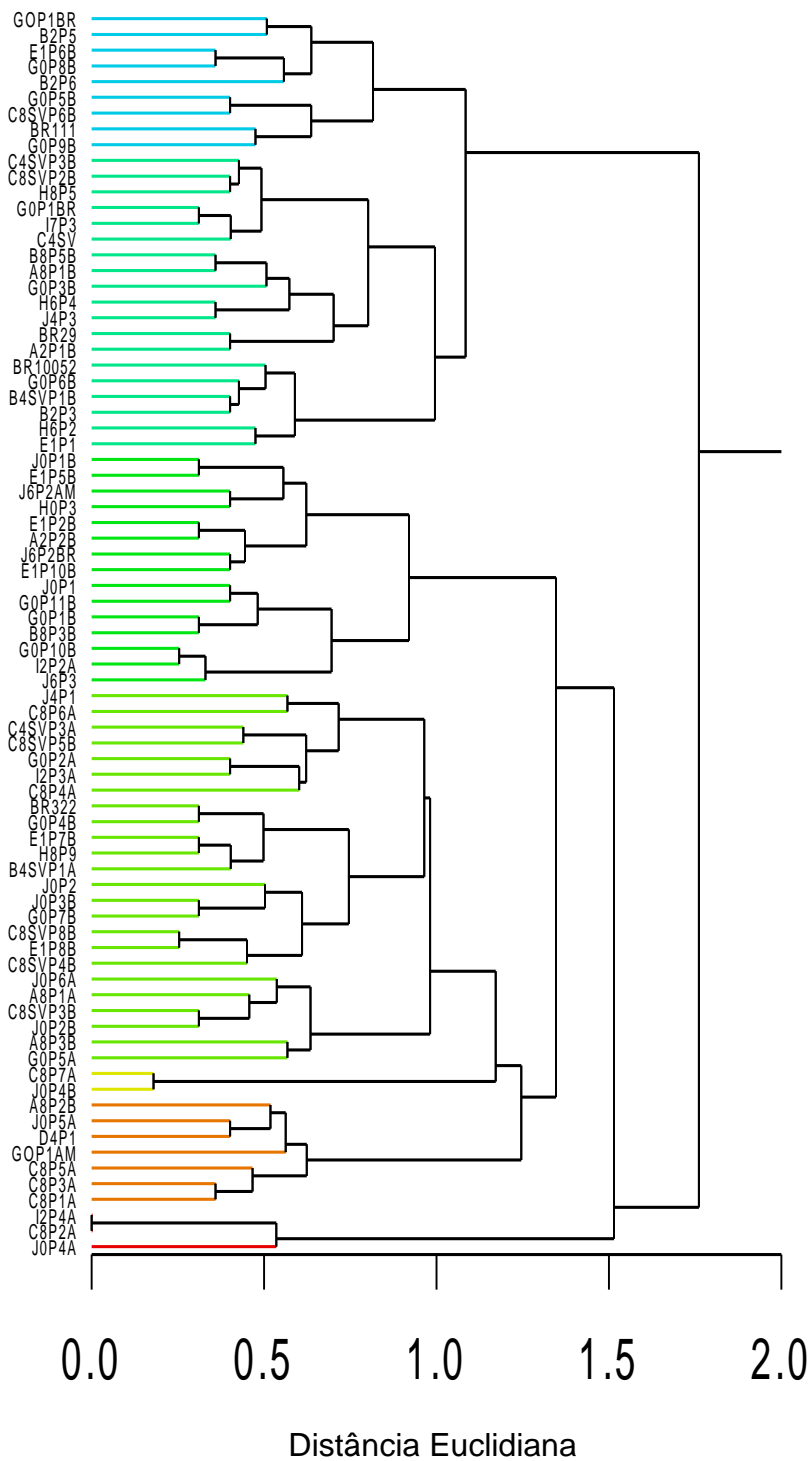


Figura 13 - Análise e agrupamento de isolados bacterianos de nódulos com base nos perfis de amplicons gerados por BOX-PCR.

#### 5.4 Diversidade genética dos isolados de bactérias

Como a maioria dos isolados apresentou padrões específicos de amplicons gerados por BOX-PCR, todos os isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene rRNA 16S para análise filogenética e comparação das estruturas das comunidades de bactérias de nódulos das duas áreas avaliadas.

A afiliação taxonômica das sequências obtidas foi realizada através da comparação com sequências depositadas no Ribossomal Database Project, com base na distância evolutiva entre as mesmas (Tabela 4). Houve um predomínio de bactérias dos gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*

Dentro do domínio *Bacteria*, os filos que predominaram foram *Fimicutes* (45% dos isolados) e *Proteobacteria* (55% dos isolados). Do Filo *Proteobacteria* foram detectados membros das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria nas duas áreas amostradas. Apenas uma bactéria, isolada de um nódulo encontrado em Picinguaba foi classificada como pertencente ao Filo *Actinobacteria*, e apresentou alta similaridade com o gênero *Leifsonia*,

Na tabela 5 são apresentadas as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura de amostragem. As distâncias evolutivas (D) escolhidas para definição das UTOs neste trabalho foi de 0,03.

Em Picinguaba, pelo índice de Chao1, a estimativa de riqueza de UTOs foi significativamente maior do que a riqueza de UTOs em Santa Virginia. Os índices de Shannon e a recíproca do índice de Simpson mostraram uma menor diversidade de bactérias nas amostras em Santa Virginia quando comparadas com Picinguaba

Tabela 4 – Afiliação taxonômica dos isolados bacterianos de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica, a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S

(continua)					
Isolado	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
<b>Isolados Pinguaba</b>					
J0p1	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinobacteridae	Leifsonia
G0p10	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
G0p3	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
J0p6A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
E1p1B	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
J0p2	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
G0p6B	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND
G0p2	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND
J4p3	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND
G0p2B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND
G0p8B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
G0p10B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
A2p1B	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Lysinibacillus
E1p8B	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Bacillaceae	Lysinibacillus
E1p7B	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	ND
C8p2A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
C8p7A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
G0p6A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
G0p5A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
C8p9A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
J0p1A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
H8p5	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
G0p6	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
G0p11	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
G0p8	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	ND
C8p4A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	ND	ND
E1p1	Firmicutes	Bacili	Bacillales	ND	ND
C8p5A	Firmicutes	Bacili	ND	ND	ND
G0p2	Firmicutes	ND	ND	ND	ND
B2p6	ND	ND	ND	ND	ND
J0p4B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	ND
G0p7B	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium
G0p9B	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium

Tabela 4 – Afiliação taxonômica dos isolados bacterianos de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica, a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S

(conclusão)

Isolado	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
E1p2B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Sternotrophomonas
G0p3B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dyella
E1p6B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter
E1p5B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
J6p2	Proteobacteria	ND	ND	ND	ND
B2p5	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
A8p1A	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	Pseudomonas
G0p5B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	Pseudomonas
J0p1B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	Pseudomonas
J0p3B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
A8p3B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	Pseudomonas
G0p4B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	ND
G0p11B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	ND
J0p2B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonaceae	ND
<b>Isolados Santa Virginia</b>					
C8SVp1B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
C8SVp3B	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia
B4SVp1	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
B4SVp1A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
B4SVp3A	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
C8SVp1	Firmicutes	Bacili	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus
C8SVp8B	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium
C4SVp3B	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium
C8SVp5B	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND

ND= não determinado

Tabela 5 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras

Comunidade	NS <sup>a</sup>	NU <sup>b</sup>	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA <sup>e</sup>
			ACE	Chao1	Shannon <sup>c</sup>	1/D <sup>d</sup>	
D = 0,03							
Picinguaba	44	30	260 (95,8; 846,2)	116,5 (58,6; 300,4)	3,22 (3,089; 3,487)	0,304 ( 0,32; 0,29)	0,41
Santa Virginia	9	3	11,4 (5,7; 61,2)	9,5 (5,5; 45,9)	1,427 (1,031; 1,823)	0,700 (0,96; 0,548)	0,670

Para a definição de UTOs utilizou-se D = 0,03.

<sup>a</sup>Número de sequências.

<sup>b</sup>Número de UTOs determinado pelo DOTUR.

<sup>c</sup>Estimador de máxima semelhança.

<sup>d</sup>Recíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança).

<sup>e</sup>Estimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Na tabela 6 são apresentados os grupos taxonômicos mais abundantes encontrados em Picinguaba e Santa Virgínia. De maneira geral as UTOs mais abundantes em ambas as áreas representam o gênero *Paenibacillus*.

Tabela 6 - Frequência dos grupos taxonômicos de bactérias isoladas de nódulo de leguminosas da Mata Atlântica em Picinguaba e Santa Virgínia,

Grupos Taxonômicos		Picinguaba	Santa Virgínia
		% Total	% Total
<i>Acidobacteriaceae</i>	<i>Leifsonia</i>	2,13	NO
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	10,64	NO
	<i>Lysinibacillus</i>	5,25	NO
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	5,25	22,22
<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	22,28	44,44
	ND	2,13	NO
<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	12,64	NO
	ND	12,64	NO
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Novosphingobium</i>	4,25	NO
	<i>Sphingobium</i>	NO	22,22
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Sternotrophomonas</i>	2,13	NO
	<i>Dyella</i>	2,13	NO
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	2,13	NO
<i>Enterobacteriaceae</i>	NO	2,13	11,12
Não determinado		14,89	NO
TOTAL		100	100

NO= não observado

O agrupamento das sequências em UTOs resultou em total de 36 UTOs, sendo 30 com representantes apenas de Picinguaba, 3 UTOs com representantes apenas de Santa Virgínia e 3 UTOs com representantes de ambos os locais. Das 30 UTOs contendo sequências oriundas de Picinguaba, 25 continham apenas 1 sequência. Essas UTOs apresentaram relação filogenética com *Actinobacteria* (1UTO), *Alphaproteobacteria* (1 UTO ), *Proteobacteria* (16 UTOs), *Firmicutes* (6 UTOs) e uma com a classificação taxonômica não definida. Das 3 UTOs formadas apenas por sequências de isolados de Santa Virgínia, duas possuem apenas uma sequência,

sendo ambas *Proteobacteria*, porém pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Sphingomonadaceae*, respectivamente. Os dados mostram que alguns genótipos bacterianos ocorrem em ambas as regiões, apesar da maior abundância de espécies em Picinguaba (Figura 14).

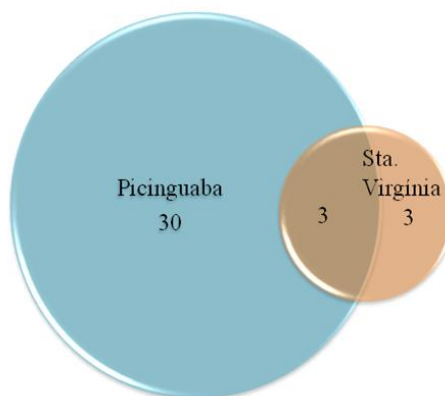


Figura 14 - Diagrama de Venn com a distribuição de UTOs de *Bacteria* em Picinguaba e Santa Virgínia.

A análise da estrutura da comunidade das bactérias dos nódulos de leguminosas de Picinguaba e Santa Virgínia utilizando-se S-LIBSHUFF mostrou que essas comunidade não diferem estatisticamente entre si (LIBSHUFF  $P = 0,001$ ; Bonferroni corrigido  $P$  para comparação de duas bibliotecas é  $0,005$ , utilizando “*experimentwise*”  $P = 0,01$ ) (Tabela 7). Assim, os dados sugerem que não existe seleção de populações bacterianas do interior de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica, independente da posição geográfica das mesmas.

Tabela 7 - Valores de  $p$  calculado nas comparações múltiplas entre as bactérias isoladas de Picinguaba e Sta. Virgínia, por s-libshuff

Homólogo	Heterólogo	
	Picing.	Sta. Virg.
Picinguaba	-	0,2222
Sta. Virg.	0,7854	-

Valores mínimos para diferença significativa: 0,0050 e 0,0253 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.



Foi observado ainda que algumas UTOs apresentavam sequências de bactérias de nódulos amostrados na mesma época do ano. Por exemplo, umas das UTOs apresentou sequências apenas de isolados de nódulos de leguminosas de Picinguaba amostrados na primavera. Adicionalmente três deles eram provenientes de uma mesma sub-parcela, e provavelmente se originaram na mesma planta. Apesar disto, uma das UTOs apresentou sequências de isolados de Picinguaba e de Santa Virginia, e seus isolados foram coletados em diferentes épocas do ano, porém, todos pertencentes a família *Paenibacillaceae*. Zahran (2001) relata que bactérias simbiotes encontradas em leguminosas de ambientes naturais, como em florestas, são mais tolerantes a condições impróprias para o seu crescimento, como o caso de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* crescendo em leguminosas de regiões áridas.

O gênero bacteriano mais abundante encontrado nos nódulos de leguminosas das áreas amostradas foi *Paenibacillus*, representando praticamente a metade de toda a população analisada no presente trabalho. Porém, não foi possível a identificação dos isolados até o nível de espécie, sugerindo tratar-se de novas espécies bacterianas.

Tem sido relatada uma estreita relação entre os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com o gênero *Paenibacillus*, sendo que em simbiose, ambos os gêneros foram eficientes em promover a nodulação e o crescimento de diversas leguminosas devido a liberação de fitormônios, aumento na solubilização de nutrientes e controlando patógenos (PETERSEN et al., 1996; SILVA et al., 2007). Apesar disso, esse gênero ainda não foi descrito como sendo a bactéria nodulífera, como foi comprovado no presente trabalho. Em contraste, o gênero *Burkholderia* tem sido associado com o desenvolvimento de nódulos em diversas espécies de leguminosas (BARRETT & PARKER, 2006; GARAU et al., 2009), em diversos ambientes, inclusive em florestas temperadas e na floresta Amazônica (SILVA, 2006). *Burkholderia tuberum* foi isolada de *Aspalathus carnosus* na África do Sul. Já *Burkholderia phymatum* foi isolada de nódulos de *Machaerium lunatum* na Guiana Francesa (VANDAMME et al., 2002). Na Mata Atlântica, apenas 4 isolados foram afiliados ao gênero *Burkholderia*, e podem representar espécies novas.

O agrupamento obtido a partir dos perfis gerados no BOX-PCR não foram similares aos obtidos com base na similaridade do gene rRNA 16S (UTOs). Apenas

alguns isolados mantiveram-se nos mesmos grupos, como é o caso dos isolados C8SVp1B e C8SVp3B, que estavam no grupo IV dos perfis do BOX-PCR e estão na mesma UTO, ambas classificadas como *Burkholderia*. Alguns isolados que apresentaram alta similaridade no perfil do BOX-PCR foram classificados em gêneros diferentes com base no sequenciamento do gene rRNA 16S, devido possivelmente as diferentes regiões do genoma estudado em cada técnica (BINDE et al., 2009). Menna et al., (2009) também obteve resultado semelhante com relação a correlação de agrupamento entre BOX-PCR e sequências do gene rRNA 16S. Os autores relatam a dificuldade de usar a técnica de agrupamento para identificar espécies, apesar da análise combinada de rRNA 16S e produtos de BOX-PCR poder gerar resultados mais acurados da filogenia e classificação taxonômica de estirpes de rizóbios.

Pode-se observar através do sequenciamento dos isolados bacterianos que diversos gêneros não apresentam bactérias normalmente consideradas nodulíferas de leguminosas, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*. É possível que essas bactérias representem endofíticos de nódulos. Zakhia et al. (2006) relatam que as bactérias assimióticas mais abundantes encontradas dentro dos nódulos de leguminosas de uma floresta na Tunísia eram *Bacillus* e *Pseudomonas*. Alguns desses endofíticos são também diazotróficos e podem ter co-evoluído com bactérias nodulíferas através da aquisição de genes por transferência lateral (TRINICK et al., 1989).

Em um relevante trabalho realizado por Li et al. (2009) foram encontrados vários gêneros de bactérias endofíticas isolados de nódulos de soja tais como *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* e *Burkholderia*, muitos dos quais semelhantes aos encontrados neste trabalho, confirmando a existência de bactérias endofíticas no interior dos nódulos.

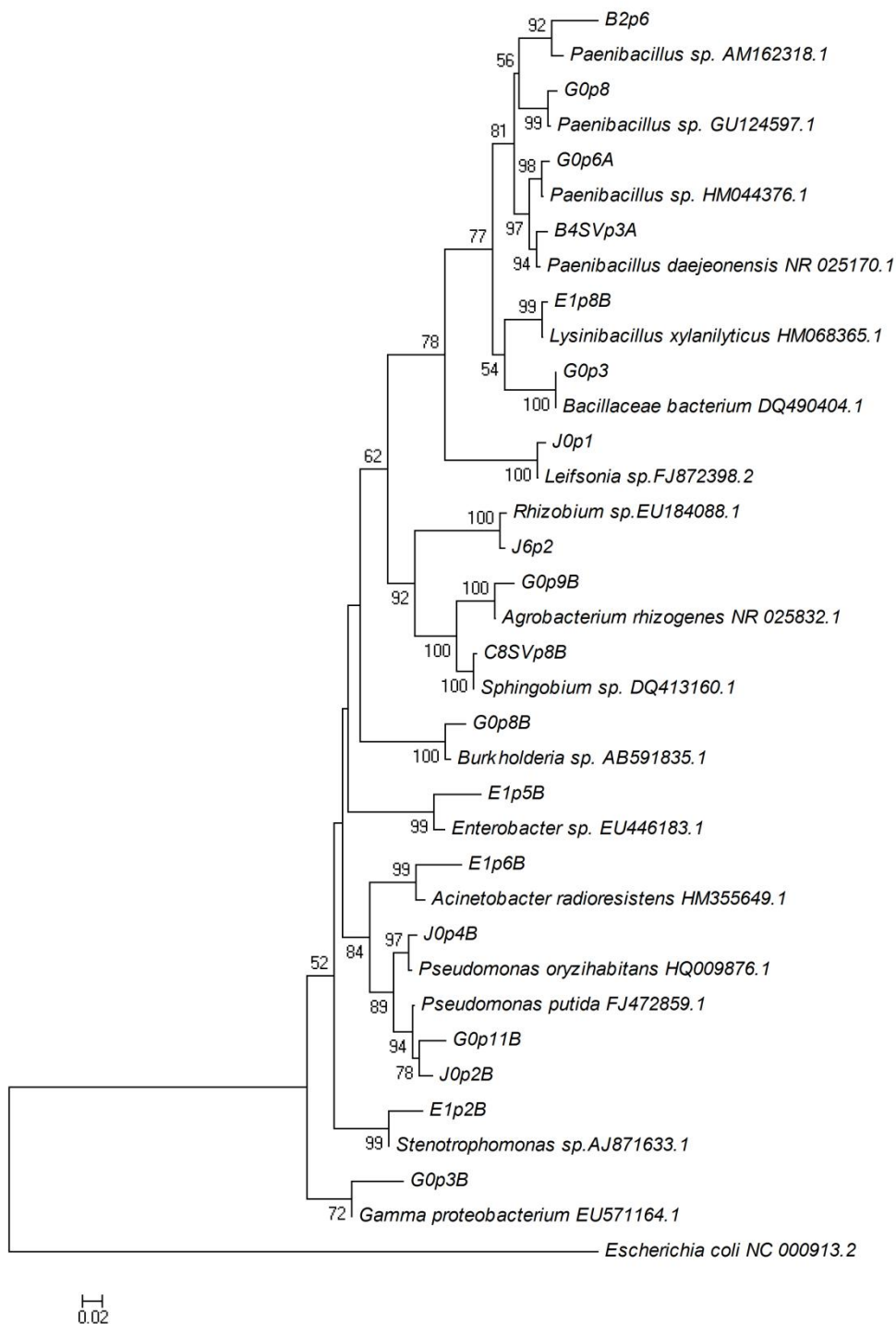


Figura 15 - Árvore filogenética das sequências do gene rRNA 16S gerada pelo parâmetro Kimura2. dos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio da Mata Atlântica.

### 5.5 Detecção da presença do gene *nifH*

A presença do gene *nifH* é uma importante característica de bactérias diazotróficas. No presente trabalho, foram avaliadas todas as bactérias isoladas de nódulos com relação a presença do gene *nifH*, porém, obtivemos sucesso com apenas alguns isolados. O pequeno número de isolados nos quais foi detectada a presença dos genes *nifH* por PCR pode representar genótipos bacterianos contendo genes *nifH* divergentes do conhecidos (ZEHR et al., 2003). Portanto, a caracterização completa do gene *nifH* desses isolados seria importante para avaliar a diversidade de diazotróficos na Mata Atlântica. No presente trabalho, mesmo utilizando 2 conjuntos de iniciadores para amplificar o gene *nifH*, não foi possível a amplificação dessa região em todos os isolados. Com isso, não se pode afirmar que os isolados nos quais não foi detectado o fragmento diagnóstico do gene *nifH* não possuam o mesmos.

A amplificação por PCR do gene *nifH* foi observada em 9 isolados, além da estirpe de referência *R. tropici*. (Br322) (Figura 16). Os isolados cuja amplificação do gene *nifH* foi positiva foram identificados como sendo bactérias diazotróficas, sendo dos gêneros *Paenibacillus*, *Burkholderia*, e da família *Bradyrhizobiaceae*.

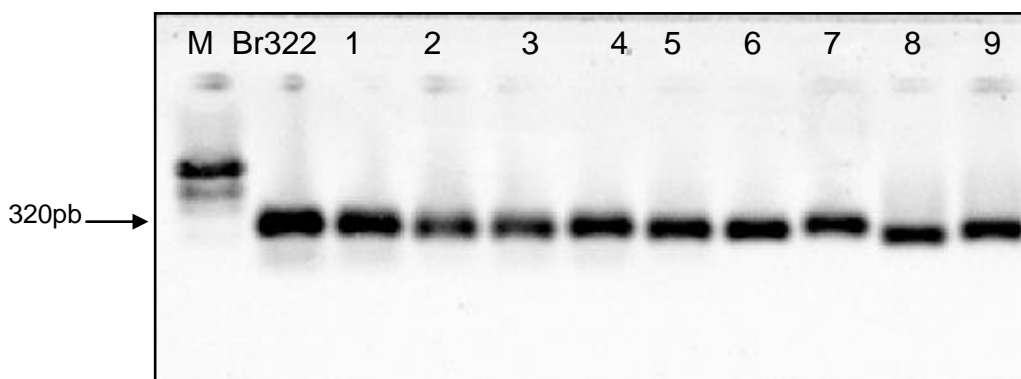


Figura 16 - Gel de amplificação específico para o gene *nifH* de isolados de bactérias da Mata Atlântica. M-marcador, Br322- *Rhizobium tropici*, 1-C8p2A 2-G0p6B, 3-G0p10B, 4-G0p6, 5- J0p1B, 6-C8svp3B, 7- G0p2, 8-G0p2B, 9-G0p8B

## 5.6 Análise da capacidade de nodulação e eficiência simbiótica

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação do departamento de Ciência do Solo, ESALQ em junho de 2010 (Figura 17). Foi possível verificar na terceira semana após a germinação, sintomas de deficiência de nitrogênio em algumas plantas inoculadas. Nesse experimento dos 44 isolados inoculadas, 39 (88%) induziram a nodulação de caupi. Dados de matéria seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca de raiz (MSR) e eficiência relativa em fornecer nitrogênio (Efr) estão apresentados na Tabela 8. Apesar da alta nodulação por alguns dos isolados (69%), diferenças significativas na produção MSPA não foram observadas. Outros isolados (31%) promoveram a formação de poucos nódulos, mas induziram aumentos significativos de MSPA, comparando com os controles sem nitrogênio. Aproximadamente 29% dos tratamentos inoculados com rizóbios isolados apresentaram Efr significativamente superior ao controle sem N. No entanto, nenhum isolado apresentou Efr similar á do controle com N.

Os nódulos, apesar de abundantes em alguns tratamentos, eram pequenos e esbranquiçados, sugerindo baixa atividade de fixação de N, o que poderia explicar a baixa eficiência em aumentar a produção de MSPA. Um fator limitante neste tipo de experimento é a espécie de leguminosa utilizada. Se a mesma não for a espécie hospedeira de onde as bactérias foram isoladas, pode existir incompatibilidade, resultando na não formação de nódulos ou em nódulos não funcionais (NOBREGA, 2006). Assim, não é possível afirmar que os isolados que não induziram a formação de nódulos não são bactérias nodulíferas. Experimentos adicionais, utilizando outras espécies de leguminosas, inclusive a leguminosa de onde os nódulos foram isolados, poderiam ser realizados para determinar se os isolados que não nodulam o caupi são realmente nodulíferos.

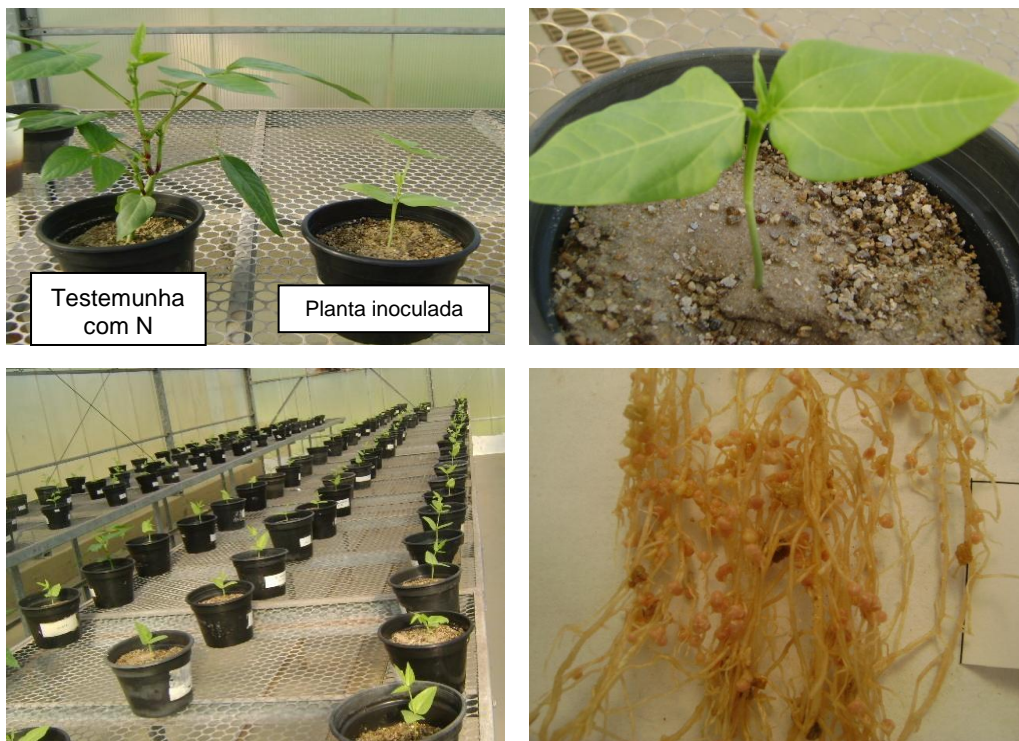


Figura 17 - Visualização parcial do experimento de autenticação dos isolados de bactérias que nodulam leguminosas em casa de vegetação e nódulos observados nas raízes.

A produção de MSPA das plantas controle com nitrogênio mineral foi relativamente maior quando comparada com as plantas inoculadas. Apesar disso, as plantas inoculadas apresentaram produção de MSPA semelhante às estirpes de referência, e superior às plantas sem nitrogênio e sem inoculação. Hara & Oliveira (2005) também observaram baixa eficiência dos seus isolados de rizóbio em aumentar a produção de matéria seca e atribuem este fato a baixa capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico da população de bactérias nativas. Contudo, o acúmulo de MSPA tende a ser maior nos tratamentos com adição de nitrogênio, já que o desenvolvimento dos nódulos e o processo de fixação de nitrogênio requerem um consumo de energia elevado. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que as bactérias isoladas da Mata Atlântica possuem eficiência variada em fornecer nitrogênio em simbiose com caupi. Porém, outros testes devem ser realizados com uma maior gama de hospedeiros para verificar quais as possíveis limitações para uma eficiente simbiose.

TABELA 8 - Valores médios de matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (Efr) em caupi inoculada com isolados de bactérias diazotróficas da Mata Atlântica.

Tratamento	Continua			
	MSPA g planta <sup>-1</sup>	MSR g planta <sup>-1</sup>	NN*	Efr (%)
Com Nitrogênio	3,93 a	3,16 a	0,00 c	100,00 a
J0p4A	0,69 b	0,16 b	63,34 a	15,10 b
B2p5	0,61 b	0,16 b	67,00 a	13,10 b
G0p10B	0,58 b	0,17 b	63,34 a	12,13 b
G0p11B	0,57 b	0,12 b	71,00 a	11,96 b
Gop11	0,56 b	0,22 b	15,00 b	11,62 b
J0p6B	0,53 b	0,11 c	57,33 a	11,22 b
J0p1A	0,53 b	0,20 b	7,33 c	10,85 b
A2p2B	0,52 b	0,29 b	5,00 c	10,69 b
G0p3	0,51 b	0,20 b	18,00 b	10,43 b
B2p3	0,50 b	0,34 b	0,00 c	10,26 b
G0p6A	0,49 b	0,15 b	49,33 a	9,84 b
G0p5A	0,48 b	0,12 b	3,00 c	9,75 b
H8p5	0,46 b	0,23 b	4,33 c	9,16 c
G0p1	0,46 b	0,14 b	50,00 a	8,99 c
C8SVp3B	0,35 c	0,28 b	3,33 c	8,99 c
C8p5A	0,45 c	0,31 b	9,67 b	8,90 c
A8p1A	0,44 c	0,14 b	25,33 b	8,74 c
J0p5A	0,43 c	0,17 b	20,67 b	8,33 c
G0p2	0,42 c	0,21 b	14,33 b	8,14 c
BR322	0,43 c	0,18 b	49,00 a	8,06 c
B4SVp1	0,41 c	0,12 b	37,00 a	7,99 c
C8SVp3B	0,41 c	0,17 b	13,00 b	7,97 c
H8p9	0,41 c	0,14 b	0,00 c	7,89 c
C8p2A	0,41 c	0,19 b	23,00 b	7,88 c
G0p2B	0,40 c	0,22 b	15,00 b	7,63 c
G0p1	0,30 c	0,23 b	0,00 c	7,63 c
BR29	0,40 c	0,17 b	32,67 a	7,55 c
G0p8B	0,39 c	0,13 b	44,34 a	7,29 c
J6p3	0,37 c	0,33 b	2,34 c	6,96 c
E1p1	0,34 c	0,17 b	16,00 b	6,78 c
J0p3B	0,36 c	0,11 c	41,00 a	6,70 c
G0p9B	0,36 c	0,15 b	16,34 b	6,70 c

TABELA 8 - Valores médios de matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e eficiência relativa (Efr) em caupi inoculada com isolados de bactérias diazotróficas da Mata Atlântica.

Tratamento	MSPA g planta <sup>-1</sup>	MSR g planta <sup>-1</sup>	NN*	(Conclusão)
				Efr (%)
C4SVp3A	0,36 c	0,20 b	6,67 c	6,61 c
C8p2A	0,36 c	0,20 b	7,67 b	6,53 c
BR111	0,35 c	0,13 b	33,34 a	6,44 c
C8p5A	0,34 c	0,23 b	5,33 c	6,36 c
J0p2	0,34 c	0,18 b	6,33 c	6,19 c
G0p6	0,33 c	0,14 b	16,67 b	6,11 c
C0p2	0,34 c	0,15 b	4,00 c	6,10 c
C4SVp3B	0,33 c	0,13 b	18,67 b	5,94 c
BR10052	0,33 c	0,14 b	21,67 b	5,77 c
J4p6	0,33 c	0,16 b	5,67 c	5,76 c
G0p7B	0,34 c	0,20 b	0,00 c	5,56 c
B2p6	0,32 c	0,15 b	12,67 b	5,51 c
H6p2	0,30 c	0,17 b	3,33 c	5,10 c
G0p5B	0,28 c	0,13 b	0,00 c	4,50 c
Sem Nitrogênio	0,27 c	0,06 c	0,00 c	4,32 c
<b>CV%</b>	<b>31,28</b>	<b>25,61</b>	<b>31,54</b>	<b>30,46</b>

Os dados são médias de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

\*Dados transformados para  $(x + 1)^{1/2}$

As bactérias de dois nódulos de cada planta foram isolados novamente em meio de cultura YMA para a confirmação das características culturais das bactérias inoculadas, além da confirmação do genótipo por BOX-PCR. Com base nos perfis de amplicons do BOX-PCR, as bactérias isoladas dos nódulos de caupi foram do mesmo genótipo daquelas usadas para inoculação.



## 6 CONCLUSÕES

Com base nas características culturais das bactérias isoladas de nódulos de leguminosas da Mata Atlântica em de duas parcelas permanentes localizadas a aproximadamente 1000 e 100 m de altitude, não foi possível observar uma associação entre morfotipos e suas origens geográficas.

As características genotípicas determinadas por BOX-PCR sugerem a existência de uma grande diversidade de bactérias nos nódulos de leguminosas da Mata Atlântica e que genótipos idênticos não ocorrem em áreas geográficas distintas.

As comunidades de bactérias diazotróficas nodulíferas da parcela permanente de Picinguaba (100m de altitude) e de Santa Virginia (1000 m de altitude) não diferem estatisticamente, sugerindo que não ocorre seleção de populações específicas nos ambientes avaliados.

A maioria das bactérias isoladas dos nódulos de leguminosas da Mata Atlântica são capazes de formar nódulos em caupi, porém não são eficientes em promover o crescimento das plantas, se comparado com bactérias de referência recomendadas para a inoculação de leguminosas.

As bactérias mais frequentes em nódulos de leguminosas da Mata Atlântica foram *Paenibacillus*, *Burkholderia* e *Bacillus*. Algumas dessas bactérias são sabidamente diazotróficas e outras podem ser endofíticas de nódulos.



## REFERÊNCIAS

ANOLLÉS, C.G. Research Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, p. 47-68, 1997.

AYRES, J.M.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; QUEIROZ, H.L.; PINTO, L.P.; MASTERSON, D.; CAVALCANTI, R.B. **Corredores ecológicos das Florestas Tropicais do Brasil**. Tefé, Amazonas: Sociedade Civil Mamirauá, 2005. 258p.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, Bloomington, v.27, p.917-930. 2003.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5, p.911-922, 1997.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DOBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997.

BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiro no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v.4, p.145-153, 1998.

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**, Jena, v. 28, p. 57-65, 2005.

BIGGS, T.W.; DUNNE, T.; MARTINELLI, L. A. Natural controls and human impacts on stream nutrient concentrations in a deforested region of the Brazilian Amazon basin. **Biogeochemistry**, Netherland, v. 68, p.227–57, 2004.

BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York. v.83, p.897-908, 2009.

BONETTI, R. Efeito de micorrizas vesiculares arbusculares na nodulação, crescimento e absorção de fósforo e nitrogênio em siratro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.8, p.189-192. 1984.

BORÉM, R.A.T.; RAMOS, D.P. Variação estacional e topográfica de nutrientes na serapilheira de um fragmento de Mata Atlântica. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.42-59, 2002.

BROUGHTON, W.J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOULINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W.J. Flavonid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.188, n.10, p.3654-3663, 2006.

BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. Springer-Verlag. New York. 1975. 126 p.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Plant genetic control of nodulation. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.45, p.345-382, 1991.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-470, 2007.

CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, n.1, p.23-31, 1988.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>>. Acesso em: 10 out. 2010.

CHAO, A.; CHEN, T.C. **SPADE 3.1**. 2006. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw.>>. Acesso em: 20 out. 2010.

CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and Degree of Endemicity of fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5448-5456, 2000.

CLARK, D. A.; CLARK, D. B.; SANDOVAL, R.; CASTRO, M. V. Edaphic and human effects on landscape-scale distributions of tropical rain forest palms. **Journal of Ecology**, London v.76 p.2581-2594, 1995.

CLEVELAND, CC.; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H.; HOWARTH, R.W.; HEDIN, L.O.; PERAKIS, S.S.; LATTY, E.F.; VON FISCHER, J.C.; ELSEROAD, A.; WASSON, M.F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v.13, p. 623–645. 1999.

COELHO, M.R.R.; CARNEIRO, N.P.; MARRIEL, I.E. SELDIN, L. Molecular detection of gene –containing *Paenibacillus* in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown in Cerrado soil. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v.48, p.611-617, 2009a.

\_\_\_\_\_. **Métodos moleculares para estudos ecológicos de bactérias diazotróficas do gênero *Paenibacillus* em amostras ambientais**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009b. 27 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 10).

COELHO, M.R.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N.; LANYON, C.V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A.G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.42, p.48-53, 2009c.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; McGARREL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. 141-145, 2009.

COTTYN, B.; DEBODE, J.; REGALADO, E.; MEW, T.W.; SWINGS, J. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 107, p. 885-897, 2009.

DEBELLÉ, F.; MOULIN, L.; MANGIN, B. DÉNARIE, J. BOIVIN, C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v.48, n.2 p.359-365, 2001.

DeLAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.48, p.1277-1290, 1998.

DeLAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal Systematic of Bacteriology**, Baltimore, v.44, p.715-733, 1994.

DEMBA DIALLO, M.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S., VANDEKERCKHOVE, T.T.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; VAN DER GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, New York, v.6, p.400-415, 2004.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses en tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., 1975, Pullman. **Nitrogen fixation: proceedings...** Pullman: Washington State University, 1975. v. 2, p. 518-538.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. 60 p.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbani rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

EHRHARDT, D.W.; ATKINSON, E.M.; LONG, S.R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. **Science**, Washington, v. 256, p.998–1000, 1992

FARIA, S.M.; DIEDHIU, A.G.; LIMA, H.C.; RIBEIRO, R.D.; GALIANA, A.; CASTILHO, A.F.; HENRIQUES, J.C. Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.61, p. 3119-3127, 2010.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; OLIVARES, F.L.; MELO, R.B.; XAVIER, R.P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS; UFLA, DCS, 1999. p. 667-686.

FEI, H.; VESSEY, J.K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 1-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3: gusA. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.12, p.674–681, 2004.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP 3.66**. (2006) Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Acesso em: 03 out. 2010.

FENING, J.O.; DANSO, S.K.A. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p.23-29, 2002.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M., HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.38 p.911-920. 2003.

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

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragatinga**, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

FRIONI, L.; RODRÍGUEZ, A.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.6, p.275–282, 2001.

GARAU, G.; YATES, R.J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.41, p.125-134. 2009.

GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legumes species. **Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 217-229. 2006

GEHRING C. **O papel da fixação biológica de nitrogênio em Floresta Secundária e Primária da Amazônia Central**. Dissertação (Doutor) - Faculdade de Agronomia Rheinische Friedrich-Wilhelm, Universidade de Bonn, 2003.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, n. 39, p. 361 -364, 1989.

GLOUDEMANS, T. 7 BISSELING, T. Plant gene expression in early stages of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Science**, Calcutta, v.65, p.1-14, 1989.

GOVERS, F.; MOERMAN, M.; DOWNIE, J.A.; HOYKAAS, P.; FRANSSSEN, H.J.; LOUWERSE, J.; Van KAMMEN, A.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod genes are involved in inducing and early nodulin gene. **Nature**, London, v. 323, p. 564-566, 1986.

GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 485-492, 1992.

GROSSMAN, J.M.; SHEAFFER, C.; WYSE, D.; GRAHAM, P.H. Characterization of slow-growing root nodule bacteria from *Inga oerstediana* in organic coffee agroecosystems in Chiapas, Mexico. **Applied and Soil Ecology**. Amsterdam, V.29, p.236-251, 2005.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washingtonv. 183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001

HARA, F.A. S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.7, p.667-672, 2005

HASELKORN, R.; GOLDEN, J.W.; LAMMERS, P.J.; MULLIGAN, M.E. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p.485-490, 1985

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular, 347).

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence Assembly Program. **Genome Research**, New York, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecosistemas brasileiros**. 2007. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm)>. Acesso em: 09 out. 2009

INSTITUTO FLORESTAL. 2009. [http:// <www.iflorestal.sp.gov.br>](http://www.iflorestal.sp.gov.br). Acesso em: 18 mar. 2010

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

JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Baltimore, v.47, n.3, p. 895-898, 1997.

JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.8, p.769-776, 2005.



JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. Composição florística, estrutura e funcionamento da Floresta Ombrófila Densa nos Núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **III Relatório Anual da FAPESP** (Programa BIOTA/FAPESP, Processo, no 03/12595-7) 2008.

KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; de SOUZA MOREIRA, F.M.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.6, p.55-76, 1997.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; AND CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.32, p. 210-220, 2006

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSHES, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.36, n.8, p.1229-1244, 2004.

LACERDA M.S. **Composição florística e estrutura da comunidade arbórea num gradiente altitudinal da Mata Atlântica**. Tese (Doutorado em biologia vegetal) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 137p. 2001

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.

LAGUERRE, G.; BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 63, p. 4748-4758 1997.

LAMMEL, D.R.; BRANCALION, P.H.S.; DIAS, C.T.S.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizobia and other legume nodule bacteria richness in Brazilian Araucária angustifolia Forest. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.64, n.4, p.400-408, 2007.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P.A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LASTE, K.C.D.; GONÇALVES, F.S.; UCHOAS, E.S.; FARIA, S.M. **Seleção de estirpes de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com Leguminosas florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 246).

LEITÃO FILHO, H. de F. Aspectos taxonômicos das florestas do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1., 1982, Campos do Jordão. São Paulo: UNIPRESS, 1982. v. 16, p. 197-206.

LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 269 p.

LEWIS, W.M.J.R.; MELACK, J.M.; MCDOWELL, W.H.; MCCLAIN, M.; RICHEY, J.E. Nitrogen yields from undisturbed watersheds in the Americas. **Biogeochemistry**, Netherland, v.46, p.149–62, 1999.

LI, H.J.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, 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 & Biochemistry**, Oxford v.40, p.238-246, 2008.

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica, e eficiência, simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. De solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, v.1095-1104, 2005.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia v. 21, n. 6, p. 583 -606, 2002.

LONG, S.R. Rhizobium Symbiosis: Nod Factors in Perspective. **Plant Cell**, Rockville, v.8, 1885-1898, 1996.

MARCHESI, J.R. ;TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN. T.A.; FRY, J.C.; HIOM. S.J.; WADE.W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.64, p.795-799. 1998.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S. ; BALDANI, J.I. **Fixação biológica de Nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica, p.34, 1999. (Série Documentos. Embrapa Agrobiologia)

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serrapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, estado de São Paulo**. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Meio Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.15, p. 113-140, 1996.

MCKEY D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In **Advances in Legume Systematics, Part 5: The Nitrogen Factor**, ed. JI Sprent, D McKey, p. 211–28. Kew, UK: Royal Botanic Garden. 1994.

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

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, Netherlands, v. 48, p. 1-3, 2009.

MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 152p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1991.

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

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

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. 768p.

MOREIRA, F.M.S.; HUISING, E.J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais. Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, p.367, 2010.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p. 853-858. 2000.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, Washington, v.7, p.869-885, 1995.

NERONI, R.F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 60 p. (Dissertação em Solos e nutrição de Plantas) – Escola Superior na Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NOBREGA, R.S.A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosyntheses and perception and nodulation in *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum*. **Short Communication, Plant Cell Physiology**, Netherlands, v.41, n.7, p.803-807, 2000.

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

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

OLIVEIRA, L.A.; SMITH, T.J.; BONETTI, R. Efeito de adubações anteriores na nodulação e rendimento da soja e do feijão caupi num latossolo amarelo da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.16, p.195-201. 1992.

OLDROYD, G.E.D.; LONG, S.R. Identification and Characterization of Nodulation-Signaling Pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod Factor Signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, p.1027-1032, 2003

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, Malden, v.32(4b), p.793-810. 2000.

PETERSEN, D.J.; SRINIVASAN, M.; CHANWAY, C.P. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 142, p. 271-276, 1996.

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and environmental microbiology**. Washington, V.67, n.5, p.2255-2262, 2001.

PONÇANO, W.L.; CARNEIRO, C.D.R.; BISTRICHI, C. A.; ALMEIDA, F.F.M.; PRADINI, F.L. **Mapa geomorfológico do estado de São Paulo**, v.1. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. 1981.

RAMOS, M.L.G.; PARSONS, P.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I. Effect of water stress on nitrogen-fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, p. 728. 1995.

RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária . Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 26p. 2003.

RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The Rhizobium-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p.124-142, 1995.

RIELY, B.K.; ANE, J.M.; PENMETSA, R.V.; COOK, D.R. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p.408-413, 2004.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W.. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v.1, p.283-290, 2007b.

RZHETSKY, A.; NEI, M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. **Molecular Biology and Evolution** Oxford, v.9, p. 945-967. 1992

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v. 4 p. 406-425. 1987

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente. **Atlas das unidades de conservação do Estado de São Paulo**. Parte 1. Litoral. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente; CESP.1996.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCUDELLER V.V.; MARTINS F.R.; SHEPHERD G.J. Distribution and abundance of arboreal species in the Atlantic ombrophilous dense forest in Southeastern Brazil. **Plant Ecology**, Taiwan, v.152, p.185-199. 2001.

SETZER, J. **Atlas climatológico do estado de São Paulo**. Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai. CESP, São Paulo. 1966. 96p.

SILVA, R.C.; PEREIRA, J.M.; ARAUJO, Q.R.; PIRES, A.J.V.; DEL REI, A.J. Alterações nas propriedades químicas e físicas de um Chernossolo com diferentes coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p.101-107, 2007a.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus promotoras* de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá. V.9, n.3, p.331-338, 2007.

SIMONET, P.; GROJEAN, M.C.; MISRA, A.K.; NAZARET, S. COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.3278-3286, 1991.

SINGLETON, D.R.; FURLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

SOS MATA ATLÂNTICA. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005**. 2008. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

SOUZA, L.A.G. Levantamento da habilidade nodulífera e fixação simbiótica de N<sub>2</sub> nas Fabaceae e da Região Amazônica. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.6, 2010, 11p.

SOUZA NETO, E.R. **Perdas de nitrogênio pela emissão de óxido nítrico (N<sub>2</sub>O) e sua relação com a decomposição da serrapilheira e biomassa de raízes da Floresta de Mata Atlântica**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Chapman and Hall, 1990. 256 p.

STRALIOTTO, R; RUMJANEK, M.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para estudo da biodiversidade de rizóbio**. Seropédica, RJ, EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, 60p. (EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, Documentos, 93), 1999.

SWELIM, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and fertility of soils**, New York, v.25, p.224-232, 1997.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A regeneração de uma floresta tropical montana após corte e queima. (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**. São Paulo, v.59, n.2, p.239-250, 1999.

TRINICK, M.J.; GOODCHILD, D.J.; MILLER, C. Localization of bacteria and hemoglobin in root nodules of *Parasponia andersonii* containing both *Bradyrhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p. 2046–2055. 1989.

- UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.1414-1417, 1995.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Washington v.54, p.2285-2289, 2004.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.; VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.25, p.507-512, 2002.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal**. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.
- VERMA, S.C.; CHOWDHURY, S.P. TRIPATHI, A.K. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.313-322, 2004.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M.A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford; Edinburgh: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.
- VINUESA, P.; RADEMARKER, J.L.W.; BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.6, p.2096-2104, 1998.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p. 5261-5267, 2007.
- WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A.; SEIDLER, R.J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.2, p.374-380, 1999.

WILCKE, W.; YASINI, S.; VALAREZ, C.; SECH, W. Change in water quality during the passage through a tropical montane rain forest in Ecuador. **Biogeochemistry**, Netherland, v. 55, p.45–72, 2001.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.386-392, 1998.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes, 1981), **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.; EVANS, H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. York: Chapman & Hall, 1992. p. 43–86.

\_\_\_\_\_. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**. Netherlands, v.186, p.45-52, 1996.

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

ZAKHIA, F., JEDER, H., WILLEMS, A., GILLIS, M., DREYFUS, B., DE LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera Microbacterium and Starkeya. **Microbial Ecology**, New York, v.51, p.375–393, 2006.

ZEHR, J.P.; BRAUN, S.; CHEN, Y. MELLON, M. Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase activity. **Journal of Experimental marine biology**, Netherlands, v.203, p.61-73, 1996.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Malden, v.5, n.7, p.539-554, 2003.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, 2003.



## **ANEXOS**



## **Anexo A** - Composição do meio 79 para crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio

Meio 79 Fred & Waksman, 1928 similar ao meio YMA - Vincent, 1970

- 10 g manitol ou sacarose
- 1 mL sol.  $K_2PO_4$  (10%) (ou  $0,1 \text{ gL}^{-1}$ )
- 4 mL sol.  $KH_2PO_4$  (10%) (ou  $0,4 \text{ gL}^{-1}$ )
- 2 mL sol.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (10%) (ou  $0,2 \text{ gL}^{-1}$ )
- 1 mL sol. NaCl (10%) (ou  $0,1 \text{ gL}^{-1}$ )
- 100 mL extrato de levedura (ou  $0,4 \text{ gL}^{-1}$  em pó)
- 5 mL sol. 0.5% azul de Bromothymol em 0,2 N KOH
- Completar para 1000 mL com água destilada
- pH 6,8-7,0

Meio sólido: 15 g Agar

Meio semi-sólido: 1,75 g Agar

Autoclavar a  $120^\circ\text{C}$  por 15 min

**Anexo B - Solução de Hoagland & Arnon (1950)**

Composição	Volume
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mL
KCl	10mL
$\text{CaCl}_2$	10mL
$\text{FeCl}_3$	1mL
Solução de micronutrientes*	1mL
Água destilada (completar para)	1000mL

pH = 6,7 , ajustar com KOH

\*Solução de micronutrientes (para 1L de água)

$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	2,86g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	2,03g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,22g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,08g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	0,09g

**Anexo C - Caracterização morfológica dos isolados de bactérias nativas que nodulam leguminosas arbóreas isoladas do Parque estadual de Picinguaba e Santa Virginia, na Serra do Mar, SP.**

(Continua)

ISOLADOS	ORIGEM	pH	CONSISTÊNCIA	COR	CRESC.	MUCO	LUZ	BORDA
G0p1 (1)	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
G0p1 (2)	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	irregular
B2p3	Picinguaba	alcalino	seca	branca	rápido	pouco	opaca	lisa
D4p1	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	opaca	lisa
J6p3	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
B2p1	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	opaca	irregular
H8p3	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	opaca	lisa
H0p3	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	irregular
J4p1	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	opaca	lisa
C0p1	Picinguaba	neutro	seca	branca	rápido	intermediário	opaca	lisa
J0p3	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	abundante	opaca	lisa
J6p2(1)	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	lisa
J6p2(2)	Picinguaba	ácido	seca	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
G0p1	Picinguaba	ácido	gomosa	branca	rápido	abundante	translúcida	irregular
J0p1	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	pouco	opaca	irregular
H6p2	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	abundante	opaca	lisa
H8p2	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
H6p1	Picinguaba	alcalino	seca	branca	intermediário	pouco	opaca	lisa
B2p2	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
G0p3	Picinguaba	neutro	seca	branca	rápido	abundante	opaca	lisa
C4	Santa Virginia	ácido	gomosa	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	lisa
I7ap2	Picinguaba	alcalino	seca	branca	rápido	intermediário	opaca	lisa
J0p2	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
E1bp1	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
E1bp2	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	lento	pouco	opaca	lisa
J4p3	Picinguaba	neutro	gomosa	branca	rápido	abundante	translúcida	irregular
D4p2	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	abundante	opaca	lisa
G0p2	Picinguaba	neutro	seca	branca	lento	pouco	opaca	lisa
E1ap1	Picinguaba	alcalino	seca	branca	rápido	abundante	opaca	lisa
B4SVp1	Santa Virginia	neutro	seca	branca	lento	pouco	opaca	lisa

**Anexo C - Caracterização morfológica dos isolados de bactérias nativas que nodulam leguminosas arbóreas isoladas do Parque estadual de Picinguaba e Santa Virginia, na Serra do Mar, SP.**

(Continuação)

ISOLADOS	ORIGEM	pH	CONSISTÊNCIA	COR	CRESC.	MUCO	LUZ	BORDA
J4p2	Picinguaba	neutro	seca	branca	rápido	abundante	opaca	lisa
H8p1	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
J6p1	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
J6p4	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	opaca	lisa
G0p10	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	intermediário	pouco	opaca	lisa
G0p11	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	intermediário	translúcida	lisa
H8p5	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	irregular
H8p9	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	lisa
J4p6	Picinguaba	neutro	seca	branca	rápido	abundante	opaca	lisa
I7ap3	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	opaca	lisa
J6p5	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	intermediário	translúcida	lisa
C0p2	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	intermediário	pouco	translúcida	lisa
G0p6	Picinguaba	alcalino	gomosa	branca	rápido	abundante	translúcida	lisa
G0p7	Picinguaba	alcalino	seca	branca	rápido	abundante	opaca	lisa
H6p5	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	irregular
G0p8	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
G0p13	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	intermediário	translúcida	lisa
B2p5	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
B2p6	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	intermediário	translúcida	lisa
G0p5	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	intermediário	opaca	lisa
H6p4	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	intermediário	pouco	translúcida	irregular
G0p4	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	intermediário	translúcida	lisa
I2p2A	Picinguaba	ácido	gomosa	amarela	rápido	abundante	translúcida	lisa
C8p3A	Picinguaba	ácida	gomosa	amarela	rápido	abundante	translúcida	Lisa
J0p5A	Picinguaba	ácida	gomosa	creme	rápido	Intermediário	translúcida	irregular
C8p5A	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	intermediário	abundante	translúcida	irregular
C8p5A2	Picinguaba	neutro	seca	amarelo	intermediário	pouco	opaca	lisa
B4SV1A	Santa Virginia	ácido	seca	creme	intermediário	pouco	opaca	lisa
J0p4A	Picinguaba	neutro	seca	branca	intermediário	pouco	opaca	lisa
A8p1A	Picinguaba	neutro	gomosa	branca	intermediário	abundante	translúcida	irregular
C4SV3A	Santa Virginia	neutro	gomosa	branca	intermediário	abundante	translúcida	lisa
C8p2A	Picinguaba	ácido	gomosa	branca	intermediário	abundante	translúcida	lisa

**Anexo C - Caracterização morfológica dos isolados de bactérias nativas que nodulam leguminosas arbóreas isoladas do Parque estadual de Picinguaba e Santa Virginia, na Serra do Mar, SP.**

(Continuação)

ISOLADOS	ORIGEM	pH	CONSISTÊNCIA	COR	CRESC.	MUCO	LUZ	BORDA
J0p1A	Picinguaba	ácido	gomosa	branca	rápido	abundante	translúcida	lisa
C8p1A	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	intermediário	abundante	translúcida	lisa
C8p4A	Picinguaba	neutro	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	lisa
J4p6A	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	pouco	opaca	lisa
E1p7B	Picinguaba	neutro	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	lisa
J0p4B	Picinguaba	neutro	seca	creme	rápido	pouco	opaca	lisa
G0p6B	Picinguaba	neutro	seca	amarelo	rápido	pouco	opaca	lisa
G0p7B	Picinguaba	neutro	seca	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	lisa
A8p2B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
G0p8B	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	intermediário	abundante	translúcida	lisa
G0p9B	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
E1p11B	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rápido	intermediário	opaca	irregular
E1p5B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	lisa
E1p6B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	opaca	irregular
B8p3B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
J0p3B	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
J0p2B	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	irregular
A2p1B	Picinguaba	neutro	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	lisa
A2p2B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	opaca	lisa
A8p3B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	irregular
A8p1B	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	intermediário	pouco	opaca	lisa
B8p5B	Picinguaba	ácido	gomosa	branca	intermediário	abundante	translúcida	lisa
B8p4B	Picinguaba	neutro	seca	branca	intermediário	pouco	translúcida	lisa
G0p1B	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	irregular
G0p10B	Picinguaba	neutro	gomosa	branca	rápido	intermediário	translúcida	irregular
G0p11B	Picinguaba	neutro	gomosa	branca	rápido	abundante	translúcida	irregular
E1p8B	Picinguaba	alcalino	gomosa	creme	rápido	intermediário	translúcida	lisa
E1p3B	Picinguaba	alcalino	gomosa	creme	rápido	intermediário	opaca	irregular
G0p4B	Picinguaba	neutro	seca	creme	rápido	intermediário	opaca	lisa
G0p5B	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	rápido	abundante	translúcida	lisa
E1p9B	Picinguaba	neutro	gomosa	amarelo	rápido	abundante	translúcida	lisa
C8SVp4B	Santa Virginia	ácido	gomosa	amarelo	rápido	intermediário	translúcida	lisa

**Anexo C - Caracterização morfológica dos isolados de bactérias nativas que nodulam leguminosas arbóreas isoladas do Parque estadual de Picinguaba e Santa Virginia, na Serra do Mar, SP.**

(Conclusão)

<b>ISOLADOS</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>pH</b>	<b>CONSISTÊNCIA</b>	<b>COR</b>	<b>CRESC.</b>	<b>MUCO</b>	<b>LUZ</b>	<b>BORDA</b>
E1p10B	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rapido	pouco	opaca	lisa
B4SVp1B	Santa Virginia	ácido	gomosa	amarelo	rapido	intermediário	translúcida	lisa
C8SVp8B	Santa Virginia	neutro	gomosa	amarelo	rapido	abundante	opaca	lisa
C8SVp3B	Santa Virginia	neutro	gomosa	amarelo	rapido	abundante	translúcida	lisa
Continua...								
C8SVp2B	Santa Virginia	neutro	gomosa	creme	intermediário	intermediário	translúcida	lisa
E1p2B	Picinguaba	neutro	gomosa	creme	intermediário	abundante	translúcida	lisa
E1p1B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	translúcida	lisa
J0p1B	Picinguaba	ácido	seca	amarelo	rapido	intermediário	opaca	lisa
G0p2B	Picinguaba	ácido	gomosa	creme	rapido	abundante	translúcida	lisa
G0p3B	Picinguaba	ácido	gomosa	amarelo	intermediário	abundante	opaca	irregular
C8SVp6B	Santa Virginia	ácido	gomosa	amarelo	rapido	abundante	translúcida	lisa
C4SVp3B	Santa Virginia	neutro	gomosa	creme	rapido	intermediário	translúcida	lisa
C8SVp5B	Santa Virginia	ácido	seca	amarelo	rapido	pouco	opaca	irregular
Br 322	Embrapa	ácido	gomosa	amarelo	rapido	abundante	translúcida	lisa
Br10052	Embrapa	neutro	gomosa	amarelo	rapido	abundante	translúcida	lisa
Br29	Embrapa	alcalino	gomosa	branca	intermediário	intermediário	translúcida	lisa
Br111	Embrapa	alcalino	gomosa	branca	intermediário	intermediário	translúcida	lisa