

DIVERSIDADE CULTURAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE DIAZOTRÓFICOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE BRACATINGA ¹

Natalia Carolina Moraes Ehrhardt-Brocardo², Priscila Stocco³, Antonio Luiz Tramontin⁴, Luís Carlos Iuñes Oliveira Filho⁵ e Julio Cesar Pires Santos⁶

RESUMO – O nitrogênio é um dos macronutrientes essenciais aos seres vivos, o que o torna um dos fatores limitantes para o crescimento vegetal. Apenas uma parcela dos procariotos, os diazotróficos, possui a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico para outras formas disponíveis às plantas. A bracatinga é uma espécie arbórea de importância econômica capaz de estabelecer simbiose mutualística com organismos diazotróficos, sendo os seus principais usos: produção de energia, madeira, forragem, indústria química de produtos naturais, apicultura, paisagismo e sombreamento e recuperação de áreas degradadas e zonas ripárias. Este estudo objetivou estabelecer relação entre a diversidade cultural e morfológica e a variabilidade genética dos isolados nodulantes em bracatinga de diferentes condições edafoclimáticas. Coletaram-se nódulos radiculares retirados ao acaso em sete áreas compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-Oeste do Estado de Santa Catarina. Foi observada ampla diversidade cultural entre os diazotróficos presentes, havendo predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, formato circular, borda lisa e superfície mucóide. Entre os parâmetros avaliados, a transparência da colônia, a produção de muco e a alteração do pH foram considerados relevantes para a diferenciação dos isolados. A caracterização taxonômica dos isolados foi realizada por comparação dos fragmentos sequenciados, sendo as espécies isoladas deste conjunto amostral pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*.

Palavras-chave: *Mimosa scabrella* (Benth.); FBN; Endofíticos.

CULTURAL, MORPHOLOGICAL AND GENETIC DIVERSITY OF DIAZOTROPHICS ISOLATED FROM NODULES OF BRACATINGA

ABSTRACT – Nitrogen is one of the essential macronutrients for living beings, which makes it one of the limiting factors for plant growth. Only a portion of the prokaryotes, the diazotrophs, has the ability to reduce atmospheric nitrogen to other forms available to plants. Bracatinga is an economically important arboreal species capable of establishing mutualistic symbiosis with diazotrophic organisms. Its main uses are: energy production, wood, forage, chemical industry of natural products, beekeeping, landscaping and shadowing and recovery of degraded areas and riparian zones. The present study aimed to establish relationship between cultural and morphological diversity and genetic variability from nodules of bracatinga isolated in different edaphoclimatic conditions. Root nodules randomly collected from seven areas between the Vale do Itajaí, Plateau South and Midwest of the State of Santa Catarina. Broad cultural diversity was observed among the present diazotrophs, and there was a predominance of fast-growing isolates of colony with milky white

¹ Recebido em 25.02.2014 aceito para publicação em 07.07.2015.

² Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Mestrado em Manejo do Solo, Lages, SC - Brasil. E-mail: <biosapos@gmail.com>.

³ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Programa de Pós-Graduação em Manejo do Solo, Lages, SC - Brasil. E-mail: <stocco.priscila@gmail.com>.

⁴ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Mestrado em Manejo do Solo, Lages, SC - Brasil. E-mail: <biosolos@gmail.com>.

⁵ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Doutorado em Manejo do Solo, Lages, SC - Brasil. E-mail: <iunes1981@gmail.com>.

⁶ Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Departamento de Solos e Recursos Naturais, Lages, SC - Brasil. E-mail: <bijagica@gmail.com>.



coloration, round shape, flat edge and mucoid surface. Among the evaluated parameters, transparency of the colony, mucus production and pH modification were considered relevant to the differentiation of isolates. Taxonomic characterization of the isolates was performed by comparison of the sequenced fragments, being the isolated species of this sample set from the genera *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Rhizobium*.

Keywords: *Mimosa scabrella* (Benth.); BNF; Endophytes.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies arbóreas de interesse econômico são conhecidas dentro da família Leguminosae (Fabaceae) (AUER; SILVA, 1992). A bracatinga é uma leguminosa arbórea que apresenta capacidade de estabelecer simbiose mutualística com microrganismos do solo, notadamente com os fixadores de nitrogênio, sendo uma característica desejável para uma espécie com significativo número de usos.

Características como o rápido crescimento e elevada produtividade em altas densidades, fazem da bracatinga uma espécie que apresenta múltiplas possibilidades de uso. No noroeste do planalto catarinense, aproximadamente metade da renda dos agricultores em assentamentos de reforma agrária deve-se ao manejo de bracatingais, sobretudo na produção de lenha e carvão (STEENBOCK et al., 2011). A madeira é utilizada para vigamentos, escoras para a construção civil, móveis, caixotaria, embalagens leves, compensados, laminados e aglomerados (CARVALHO, 1994). Segundo Carvalho (1981), por ser uma espécie heliófita, perenifólia e pouco exigente quanto às condições físicas e químicas do solo, proporciona rápida cobertura de áreas de solos alterados ou degradados em que suas populações ocorrem. Regensburger et al. (2008) mencionam a utilização da espécie para recuperação de áreas degradadas pela atividade antrópica da mineração, sendo observado que a bracatinga, durante o seu desenvolvimento, auxilia no sombreamento e proteção do solo. Na indústria de produtos naturais, Petkowicz et al. (2011) descrevem o uso de sementes de bracatinga para a obtenção de galactomananas, polissacarídeos hidrossolúveis que apresentam propriedades espessantes e diversas aplicações biológicas e industriais.

O estudo da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas tem aplicações agrícolas significativas. Em termos de manejo cultural, visa promover a sobrevivência de populações mais eficientes e específicas, e a obtenção de genótipos mais adaptados aos tipos de solo e tolerantes aos diferentes estresses ambientais.

O gênero *Mimosa* pode nodular com uma ampla variedade de espécies de diazotróficos, dentre os quais, representantes das α -proteobacteria. Conforme Oyaizu et al. (1993), estirpes obtidas de *M. invisa* e *M. pudica*, isoladas nas Filipinas, foram descritas como *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*. Em Wang et al. (1999), isolados de nódulos radiculares de *M. affinis*, uma leguminosa nativa do México, foram identificados como *Rhizobium etli*. Entretanto, observou-se que se tratava de um grupo restrito de linhagens com baixa diversidade genética dentro da espécie, onde os isolados de *M. affinis* diferiam das estirpes de *Rhizobium etli* originadas a partir de plantas de feijão (*P. vulgaris*). Deste modo, foi proposto dentro de *Rhizobium etli* o bv. mimosae.

Vandamme et al. (2002) estudaram a taxonomia de isolados obtidos a partir de nódulos radiculares das leguminosas tropicais *M. pudica* e *M. diplotricha* em Taiwan. Os resultados mostraram que os isolados pertenciam a quatro espécies distintas: *Burkholderia caribensis*, *B. cepacia* gen. VI, e as novas espécies *B. tuberum* e *B. phymatum*. Outras estirpes do gênero *Burkholderia* foram isoladas de nódulos radiculares de *M. pigra*, *M. casta* e *M. pudica*, na ilha de Barro Colorado, no Panamá. Entre os 51 isolados, 44 pertenciam a estirpes de *Burkholderia*, enquanto os demais foram inseridos nos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (BARRETT; PARKER, 2005).

Chen et al. (2005) em estudo com bactérias nodulantes em *Mimosa* na América do Sul, corroboraram que estirpes de *Burkholderia* podem estabelecer de maneira eficaz uma interação simbiótica com as leguminosas. Para isso, isolaram estirpes oriundas de nódulos radiculares de espécies do gênero *Mimosa* situadas no Brasil (*M. acutistipula*, *M. bimucronata*, *M. camporum*, *M. caesalpiniaefolia*, *M. flocculosa*, *M. laticifera*, *M. pigra*, *M. scabrella* e *M. tenuiflora*) e na Venezuela (*M. pigra*). As estirpes foram classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e estavam intimamente relacionadas com outras espécies nodulantes desse gênero, como *B. caribensis*, *B. phymatum* e *B. tuberum*.

A necessidade de se incluir o uso de essências nativas no programa de reflorestamento brasileiro estimulou a pesquisa sobre processos microbiológicos associados à essas plantas e que permitem o seu estabelecimento a baixo custo (AUER; SILVA, 1992). Devido à alta eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio, pesquisas que incrementem as informações sobre a fixação em espécies arbóreas possibilitam uma redução significativa dos custos energéticos e financeiros, quando comparados com a utilização de adubos minerais, uma vez que, consiste em uma alternativa que preconiza a manutenção do equilíbrio dinâmico dos ecossistemas.

O presente estudo objetivou estabelecer relação entre a diversidade cultural e morfológica e a variabilidade genética dos isolados nodulantes em bracatinga de diferentes ambientes edafoclimáticos do Estado brasileiro de Santa Catarina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização Cultural e Morfológica dos Isolados de Diazotróficos

O levantamento da variabilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em bracatinga foi realizado por meio da coleta de nódulos radiculares em sete áreas de diferentes condições edafoclimáticas, compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-Oeste do Estado de Santa Catarina. Amostras de solo das áreas de coleta de nódulos radiculares de bracatinga foram analisadas no Laboratório de Análises de Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-Cav) (Tabela 1).

Os procedimentos para o isolamento e obtenção de culturas de diazotróficos foram realizados utilizando-se a metodologia descrita em Vincent (1970). De cada área de coleta, seis nódulos ao acaso foram destacados do sistema radicular. Após o isolamento, procedeu-se à caracterização cultural e morfológica conforme Martins et al. (1997). A estirpe Br3454 - *Burkholderia mimosarum* (CHEN et al., 2006), cedida pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ - Brasil), foi incluída na análise como referência para comparação das características culturais e morfológicas. As colônias foram avaliadas aos três e aos sete dias de crescimento quanto aos parâmetros: tempo de crescimento; diâmetro; cor; transparência; forma; borda; elevação; superfície; volume,

consistência e aparência do muco. Com a incorporação do indicador de pH azul de bromotimol no meio de cultura, a partir do quinto dia de crescimento, observou-se a coloração do meio de acordo com a natureza ácida, alcalina ou neutra dos metabólitos produzidos.

As características culturais e morfológicas dos isolados foram convertidas em uma matriz binária de presença ou ausência, agrupando-se os isolados em um Dendrograma de Similaridade, gerado por meio do aplicativo computacional PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis), utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard (HAMMER et al., 2001).

2.2. Caracterização Genética dos Isolados de Diazotróficos

A caracterização genética dos isolados foi realizada na Universidade Federal de Santa Maria (RS). Os isolados foram incubados em frascos contendo o meio líquido YM (VINCENT, 1970), por 72 horas a 28°C e 120 rpm. As etapas para o sequenciamento do gene 16S rDNA iniciaram com a extração do DNA a partir da utilização do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ conforme as instruções e protocolo fornecidos pelo fabricante (Zymo Research Corporation). Em seguida, procedeu-se à amplificação da região codificadora por técnica de PCR, empregando-se os conjuntos: 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTAC GACTT3') (LANE, 1991). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em cuba horizontal com tampão TBE 1x. As amostras foram coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia) em transiluminador de luz ultravioleta e documentadas com equipamento de fotografia digital. Para a realização do sequenciamento completo do gene ribossomal 16S, o produto da reação de PCR foi purificado com as instruções e protocolo do kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich). Posteriormente à reação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento na ACTGene Análises Moleculares Ltda.

2.3. Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos

A classificação taxonômica dos isolados obtidos iniciou com a leitura e análise dos fragmentos sequenciados utilizando-se o aplicativo computacional

Tabela 1 – Análise de solo das áreas de coleta de nódulos radiculares de bracatinga.**Table 1** – Soil analysis of the collection areas of root nodules of bracatinga.

Isolado	Município	Coordenadas (UTM)	Altitude (m)	Atributos Químicos do Solo						
				pH (H ₂ O)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**
A12	Lages	J 0573844 L 6925943 S	974	4,2	0	0,3	3,65	4	160	6,2
A31 A32	Lages	J 0574032 L 6923043 S	957	4,1	2	0,57	2,35	5	195	10,2
A42	Painel	J 0583532 L 6914676 S	1128	4,7	4	1,6	0,55	5	73	11,3
A52	Dona Emma	J 0612441 L 7016195 S	563	4,3	1	0,61	0,95	5	97	9,1
A61 A62	Rancho Queimado	J 0693333 L 6935529 S	717	4,6	2	0,76	0,75	9	198	11,5
A8	Urupema	J 0613050 L 6909807 S	1539	4,4	4	1,51	0,89	3	170	12,4
A91 A92	São Cristovão do Sul	J 0563147 L 6975450 S	1126	4,2	4	0,99	1,2	4	87	5,5

* Valores em cmolc/dm³; ** Valores em mg/dm³.

* Values in cmolc/dm³; ** Values in mg/dm³.

Staden Package (STADEN et al., 2003). A partir disso, a sequência consensual resultante foi inserida no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) na plataforma de recursos populares BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização Cultural e Morfológica dos Isolados de Diazotróficos

A partir do isolamento de diazotróficos nodulantes em bracatinga nativos de diferentes ambientes edafoclimáticos, foram obtidos nove isolados que juntamente à estirpe referência (Br3454), foram submetidos a caracterização cultural e morfológica (Tabela 2).

A estirpe referência (Br3454) apresentou como características culturais e morfológicas das colônias: rápido crescimento (até três dias), alcalinizar o meio, diâmetro maior que 1,0 mm, coloração amarela, translúcidas, formato circular e borda lisa, elevação achatada, superfície mucoide mas com pouca quantidade de muco, consistência viscosa e aparência aquosa.

Para todos os isolados o tempo de crescimento foi considerado rápido (até três dias). Com relação a algumas características coloniais, todos os isolados apresentaram colônia com diâmetro maior que 1,0 mm, formato circular e borda lisa. Quanto à coloração da

colônia, todos os isolados obtidos foram de coloração branca leitosa. Para os parâmetros elevação e transparência da colônia, sete isolados apresentaram elevação convexa e três elevação achatada, e ainda, cinco foram colônias opacas e cinco foram colônias translúcidas.

Dentre os isolados que apresentaram superfície da colônia mucóide, três foram avaliados como possuindo um volume intermediário de muco, colônias com muito muco foram obtidas em dois isolados, e apenas a estirpe referência apresentou pouco volume de muco. O volume de muco abundante não teve representante. Quanto à consistência e aparência do muco, um isolado apresentou consistência e aparência viscosa, um com consistência viscosa e aparência floculosa, três com consistência viscosa e aparência aquosa, e um com consistência viscosa e aparência gomosa. Não foram obtidos representantes com muco de consistência e aparência butírica.

Com a incorporação do indicador de pH azul de bromotimol, a partir do quinto dia de crescimento, observou-se a coloração do meio de cultura de acordo com a natureza ácida, alcalina ou neutra dos metabólitos produzidos. Dentre os isolados, seis acidificaram o meio, dois alcalinizaram e os outros dois isolados não alteraram o pH do meio.

Foi observada uma ampla diversidade cultural e morfológica (Figura 1) entre os diazotróficos presentes

Tabela 2 – Características culturais e morfológicas dos diazotróficos nativos de diferentes ambientes edafoclimáticos e estirpe referência (Br3454) em Meio YMA (VINCENT, 1970).**Table 2** – Cultural and morphological characteristics of native diazotrophics of different edaphoclimatic conditions and reference strain (Br3454) Medium YMA (VINCENT, 1970).

Isolado	Município	TC ¹	pH ²	DC ³	CC ²	TC ⁵	FC ⁶	BC ⁷	EC ⁸	SC ⁹	VM ¹⁰	CAM ¹¹
A12	Lages	R	Al	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	V
A32	Lages	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Me	F
A42	Painel	R	Ac	Ma	B	T	C	Li	A	S	-	-
A52	Dona Emma	R	N	Ma	B	T	C	Li	A	S	-	-
A61	Rancho Queimado	R	Ac	Ma	B	T	C	Li	Conv	M	Mui	A
A62		R	N	Ma	B	O	C	Li	Conv	S	-	-
A8	Urupema	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	M	Mui	G
A91	São Cristóvão do Sul	R	Ac	Ma	B	O	C	Li	Conv	S	-	-
A92		R	Ac	Ma	B	T	C	Li	Conv	M	Me	A
Br	Não Especificado	R	Al	Ma	A	T	C	Li	A	M	P	A

1 Tempo de Crescimento (R:rápida; I:intermediária; L:lenta; MT:muito lenta); 2 Alteração do pH do Meio (Ac:acidificam; Al:alcalinizam; N:não alteram); 3 Diâmetro da Colônia (Ma:maior 1,0mm; Me:menor 1,0mm); 4 Cor da Colônia (B:branca; A:amarela; R:rósea; V:vermelha); 5 Transparência da Colônia (O:opaca; T:translúcida); 6 Forma da Colônia (P:puntiforme; C:circular; I:irregular); 7 Borda da Colônia (Li:lisa; Lo:lobada); 8 Elevação da Colônia (Conv:convexa; Con:cônica; A:achatada); 9 Superfície da Colônia (S:seca; M:mucóide); 10 Volume de Muco (P:pouco; Me:médio; Mui:muito; A:abundante); 11 Consistência e Aparência do Muco (V:viscosa; F:floculosa; A:aquosa; G:gomosa; B:butírica).

nos nódulos de bracinga, havendo um predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, de formato circular, borda lisa e superfície mucóide.

3.2. Classificação Taxonômica dos Isolados de Diazotróficos

A partir dos conjuntos de bases obtidos pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S e comparação no banco de dados do NCBI, os isolados de diazotróficos foram distribuídos em quatro gêneros de α , β e γ -proteobacteria. Por meio da classificação taxonômica, constatou-se que as sequências de α -proteobacteria pertencem ao gênero *Rhizobium*, as sequências de β -proteobacteria alinharam-se com o gênero *Burkholderia* e as sequências de γ -proteobacteria foram similares aos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas* (Figura 1).

4. DISCUSSÃO

O gênero *Burkholderia* foi criado por Yabuuchi et al. (1992), para adequar o antigo grupo rRNA II de *Pseudomonas* (*P. solanacearum*, *P. pickettii*, *P. cepacia*, *P. gladiolos*, *P. mallei*, *P. caryophylli*) e que, posteriormente, foram excluídas as espécies *P. pickettii* e *P. solanacearum*, pois foram transferidas para o gênero *Ralstonia*. Membros

do gênero *Burkholderia* são organismos versáteis que ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos. O estudo destas bactérias tem aplicabilidade na área da biorremediação, na fixação biológica de nitrogênio, na promoção do crescimento vegetal, e ainda as espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, como causadoras de infecções em seres humanos, sobretudo em pacientes com fibrose cística. Tanto no ecossistema natural quanto em ecossistemas manejados, este gênero de bactérias habita comumente a rizosfera ou tecidos internos das plantas. Compant et al. (2008) considera que o grupo de bactérias com maior diversidade e adaptabilidade ambiental que realizam simbiose com plantas pertence ao gênero *Burkholderia*. Assim, o desenvolvimento de trabalhos que confirmem estas premissas, tem estimulado um interesse crescente no isolamento e experimentação do gênero *Burkholderia* na agricultura.

Na classificação taxonômica dos isolados de diazotróficos de bracinga, houve predomínio de β -proteobacteria com ocorrência de indivíduos do gênero *Burkholderia*. Conforme Coenye e Vandamme (2003), esta condição pode ser explicada pela capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, o que garante ampla distribuição geográfica e ambiental deste gênero, quando comparado a isolados pertencentes às classes de α e γ -proteobacteria.

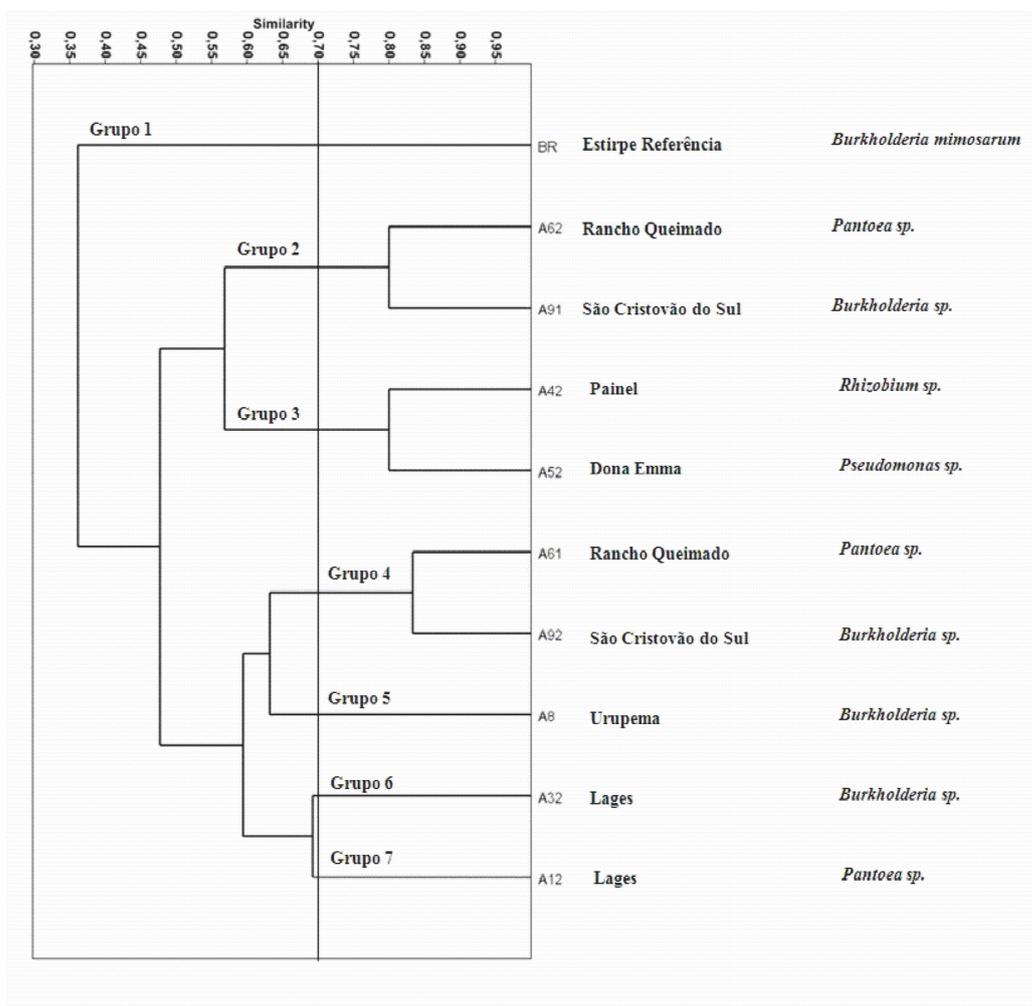


Figura 1 – Dendrograma de similaridade entre os diazotróficos nativos e estirpe referência (Br3454) com base em parâmetros culturais a 70% de similaridade.

Figure 1 – Dendrogram of similarity between native diazotrophs and reference strain (Br3454) based on the cultural parameters of 70% similarity.

A estirpe referência (Br3454) incluída nas análises para comparação das características culturais e morfológicas, foi descrita no trabalho realizado por Chen et al. (2006). Neste, foram obtidos 14 isolados oriundos de nódulos radiculares de plantas da espécie *Mimosa pigra* situadas em Taiwan e na Venezuela e ainda da espécie *Mimosa scabrella* nativa do Brasil. Com base na sequência do gene 16S rRNA, todos os isolados demonstraram-se intimamente relacionados entre si e foram classificados como representantes de uma nova espécie, para os quais se denominou *Burkholderia mimosarum* sp. nov.

O isolado A32, oriundo do município de Lages, apresentou 99% de similaridade com *Burkholderia unamae*, originalmente isolada no México em plantas de café, cana-de-açúcar e milho (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).

O isolado A8, oriundo do município de Urupema, apresentou 99% de similaridade com *Burkholderia nodosa*, isolada de nódulos radiculares de *Mimosa bimucronata* e *Mimosa scabrella* coletados no Brasil (CHEN et al., 2007).

O isolado A91, oriundo do município de São Cristovão do Sul, apresentou 99% de similaridade com

Burkholderia caledonica, isolada do solo com videira na Escócia (COENYE et al., 2001) e com *Burkholderia phytofirmans*, isolada de raízes de cebola no Canadá; da rizosfera de milho, de gramíneas e do solo na Holanda (SESSITSCH et al., 2005).

O isolado A92, oriundo do município de São Cristovão do Sul, apresentou 97% de similaridade com *Burkholderia bryophila*, isolada de *Sphagnum rubellum* na Alemanha; de pastagem permanente na Holanda; e de solo agrícola no Reino Unido (VANDAMME et al., 2007) e com *Burkholderia unamae*, isolada de café, de cana-de-açúcar e de milho no México (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).

O trabalho de Benhizia et al. (2004) foi precursor no relato de que estirpes pertencentes à classe γ -proteobacteria poderiam ocupar nódulos. Nesse estudo, foram identificadas estirpes pertencentes aos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas* a partir de nódulos radiculares de três espécies da leguminosa nativa *Hedysarum* em diferentes condições edafoclimáticas na Argélia. Posteriormente, no trabalho de Muresu et al. (2008) isolaram-se nódulos de espécies selvagens oriundos da Sardenha e Argélia. A partir da análise do gene 16S rRNA por PCR diretamente dos nódulos, constatou-se que a maioria destes continham diazotróficos simbioses como população predominante, entretanto, foi registrada a presença de outras estirpes não nodulíferas pertencentes aos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas*.

O grupo de enterobactérias do gênero *Pantoea* compreende membros isolados a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo superfície de plantas, sementes, solo, água, animais, sangue e urina humana (BERGEY; HOLT, 1994). Na maioria das vezes, são encontrados associados com uma ampla gama de hospedeiros vegetais, como não patogênicos endófitos ou epífitos, colonizando folhas, caules e raízes (DELÉTOILE et al., 2009). Neste contexto, algumas estirpes de *Pantoea* podem ser benéficas para a planta hospedeira, contribuindo para a promoção do crescimento através de processos como a produção de hormônio do crescimento, solubilização do fosfato ou fixação de nitrogênio e ainda fornecendo proteção contra várias bacterioses, doenças fúngicas e podridões pós-colheita. No entanto, estirpes de *Pantoea* também tem sido relatadas como agentes patogênicos oportunistas em seres humanos, principalmente devido à exposição a materiais hospitalares contaminados e patógenos secundários complicando doenças pré-existentes. Os

vários nichos ecológicos ocupados por espécies de *Pantoea* são indicativos de uma extensa diversificação dentro do gênero (MAAYER et al., 2012).

No estudo de Ibáñez et al. (2009), foi isolado o gênero *Pseudomonas*, pertencente à classe γ -proteobacteria, a partir de nódulos de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). O isolado ao ser reinoculado não foi capaz de formar nódulos, contudo, quando coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 6144), considerada uma estirpe eficiente, foi detectado colonizando internamente os nódulos. A partir disso, evidenciou-se que esta estirpe, pertencente à classe γ -proteobacteria, é considerada oportunista. A capacidade de membros do gênero *Pseudomonas* nodularem leguminosas foi descrita no trabalho de Shiraishi et al. (2010). Neste estudo, raízes de *Robinia pseudoacacia* (falsa-acácia) foram coletadas de uma floresta costeira e de uma Estação Experimental da Universidade de Tóquio, no Japão. Os testes de inoculação e estudos histológicos revelaram que *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. formaram nódulos.

Devido à qualidade do material, o baixo número de bases sequenciadas produziu alinhamento significativo do isolado A12, oriundo do município de Lages, com uma variedade de estirpes inseridas no banco de dados. O isolado apresentou 99% de similaridade com *Pantoea agglomerans*, isolada de sangue no Zimbábue; de cereais no Canadá; de cebola na África do Sul; e de *Wisteria floribunda* no Japão (DELÉTOILE et al., 2009); *Pantoea ananatis*, isolada de abacaxi no Brasil; e de eucalipto e cebola na África do Sul (BRADY et al., 2009); *Pantoea eucalypti*, isolada de eucalipto no Uruguai (BRADY et al., 2009); *Pantoea vagans*, isolada de eucalipto na Uganda, Uruguai e Argentina; e de milho na África do Sul (BRADY et al., 2009); *Pantoea dispersa*, isolada de solo no Japão; de sorgo na Índia; e de rosa selvagem na Holanda (BRADY et al., 2009); e *Pantoea brenneri*, isolada de expectoração e uretra humana nos EUA (BRADY et al., 2010).

O isolado A61, oriundo do município de Rancho Queimado, apresentou 98% de similaridade com *Pantoea agglomerans* e com *Pantoea vagans*.

Do mesmo modo, devido ao baixo número de bases sequenciadas, o isolado A62, oriundo do município de Rancho Queimado, obteve 92% de similaridade com *Pantoea agglomerans*; *Pantoea ananatis*; *Pantoea eucalypti* e com *Pantoea vagans*.

O isolado A52, oriundo do município de Dona Emma, apresentou 97% de similaridade com *Pseudomonas aeruginosa*.

Os organismos do gênero *Rhizobium* são caracteristicamente capazes de invadir os pêlos radiculares de leguminosas tropicais, tornando-se simbioses intracelulares (BERGEY; HOLT, 1994). Conforme Martínez-Romero et al. (1991), a partir dos primeiros trabalhos que consideravam os membros do gênero *Rhizobium* nodulantes nas raízes de leguminosas, os diazotróficos que infectavam ervilhas, trevos e o feijão comum, eram agrupados em uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum*, com três biovars (*Rhizobium leguminosarum* biovar viciae; *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii e *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli). À medida que foram surgindo trabalhos relatando o isolamento de espécies de *Rhizobium* em simbiose com outros gêneros de leguminosas, a classificação deste grupo foi se modificando. Conforme mencionado, os estudos de Oyaizu et al. (1993), Wang et al. (1999), Barrett e Parker (2005) e Liu et al. (2007) descrevem espécies de *Rhizobium* nodulantes no gênero *Mimosa*.

O isolado A42, oriundo do município de Painel, apresentou 99% de similaridade com *Rhizobium lusitanum*, isolado de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* em Portugal; e de *Macropitium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* (VALVERDE et al., 2006); *Rhizobium tropici*; e com *Rhizobium leucaenae*, isolado de nódulos radiculares de *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *Gliricidia sepium* e *Phaseolus vulgaris*.

5. CONCLUSÃO

Observou-se ampla diversidade cultural e morfológica entre os diazotróficos presentes nos nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.), havendo um predomínio de isolados de rápido crescimento, de colônia com coloração branca leitosa, de formato circular, borda lisa e superfície mucoide. Dentre os parâmetros avaliados, a transparência da colônia, a produção de muco e a alteração do pH foram considerados relevantes para a diferenciação dos isolados.

Os gêneros de bactérias mais frequentes em nódulos da leguminosa *Mimosa scabrella* (Benth.)

oriundos de diferentes condições edafoclimáticas foram *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Destes gêneros, algumas espécies são sabidamente diazotróficas e outras podem ser endofíticas de nódulos.

6. REFERÊNCIAS

- AUER, C.G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E.J.B.N. et al. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.157-172.
- BARRETT, C.F.; PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.1, p.57-65, 2005.
- BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.462-468, 2004.
- BERGEY, D.H.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 787p.
- BRADY, C. L.; VENTER, S. N.; CLEENWERCK, I.; ENGELBEEN, K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; COUTINHO, T. A. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.59, p.2339-2345, 2009.
- BRADY, C. L.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S. N.; ENGELBEEN, K.; DE VOS, P.; COUTINHO, T. A. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *P. septica* sp. nov., *P. eucrinea* sp. nov., *P. brenneri* sp. nov. and *P. conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.60, p.2430-2440, 2010.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp.

nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1165-1172, 2004.

CARVALHO, P.E.R.; COSTA, J.M. Comportamento de essências florestais em condições de arboreto em quatro locais de estado de Paraná: "Bracatinga, uma alternativa para reflorestamento" In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, Curitiba: Embrapa-URPFCS, 1981. p.161-170.

CARVALHO, P.E.R. *Mimosa scabrella* Benth. In: ARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ: Brasília: Embrapa-SPI, 1994.

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

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

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

COENYE, T.; LAEVEENS, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J. R. W.; GILLIS, M.; FALSEN, E.; VANDAMME, P.

Burkholderia fungorum sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1099-1107, 2001.

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

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Review Article - Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.4, p.607-626, 2008.

DELÉTOILE, A.; DECRÉ, D.; COURANT, S.; PASSET, V.; AUDO, J.; GRIMONT, P.; ARLET, G.; BRISSE, S. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.2, p.300-310, 2009.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, v.4, n.1, p.1-9, 2001.

IBAÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.1, p.49-55, 2009.

LIU, X. Y.; WANG, E. T.; LI, Y.; CHEN, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**, v.188, n.1, p.1-14, 2007.

MAAYER, P.; CHAN, W. Y.; BLOM, J.; VENTER, S. N.; DUFFY, B.; SMITS, T. H. M.; COUTINHO, T. A. **Research Article - The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification**. 2012. Disponível online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/625>.

- MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.3, p.417-426, 1991.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Brasília: Embrapa, 1997. 14p.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOGUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.63, p.383-400, 2008.
- OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; MINAMISAWA, K.; GAMOU, T. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.39, p.339-354, 1993.
- PETKOWICZ, C. L. O.; BOCHICCHIO, R.; REICHER, F.; SILVEIRA, J. L. M. *Mimosa scabrella*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. p.656-662.
- REGENSBURGER, B.; COMIN, J. J.; AUMOND, J. J. Integração de técnicas de solo, plantas e animais para recuperar áreas degradadas. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1773-1776, 2008.
- SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; AIT BARKA, E.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R.; WANG-PRUSKI, G.; NOWAK, J. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1187-1192, 2005.
- SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.269-274, 2010.
- STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: KRAWETZ, S.A.; WOMBLE, D.D. (Ed.) Introduction to Bioinformatics: A theoretical and practical approach. Ottawa: Human Press, 2003.
- STEENBOCK, W.; SIMINSKI, A.; FANTINI, A. C.; REIS, M. S. Ocorrência da Bracatinga (*Mimosa scabrella* BENTH.) em Bracatingais manejados e em florestas secundárias na região do Planalto Catarinense. **Revista Árvore**, v.35, n.4, p.845-857, 2011.
- VALVERDE, A.; DELVASTO, P.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E.; SANTA-REGINA, I.; BALLESTER, A.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C.; GARCÍA-BALBOA, C.; IGUAL, J. M. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from iron ore in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2421-2425, 2006.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.507-512, 2002.
- VANDAMME, P.; OPELT, K.; KNÖCHEL, N.; BERG, C.; SCHÖNMANN, S.; DE BRANDT, E.; EBERL, L.; FALSÉN, E.; BERG, G. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting

properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2228-2235, 2007.

VINCENT, J.M.A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WANG, E. T.; ROGEL, M. A.; GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar

isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1479-1491, 1999.

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) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.