



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**NODULAÇÃO DE *Mimosa pudica* L. POR BETA-RIZÓBIO ISOLADOS
DE DIFERENTES ECOSISTEMAS NO BRASIL**

LUCIANA MARQUES VERGUEIRO DA CRUZ

Sob orientação da professora
SILVIA REGINA GOI

**Seropédica/RJ
Junho/2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**NODULAÇÃO DE *Mimosa pudica* L. POR BETA-RIZÓBIO ISOLADOS
DE DIFERENTES ECOSSISTEMAS NO BRASIL**

“Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.”

Ph.D. Silvia Regina Goi
(Orientadora)

**Seropédica/RJ
Junho/2009**

**NODULAÇÃO DE *Mimosa pudica* L. POR BETA-RIZÓBIO ISOLADOS
DE DIFERENTES ECOSSISTEMAS NO BRASIL**

LUCIANA MARQUES VERGUEIRO DA CRUZ

Aprovada em: 30/06/09

Banca examinadora:

Orientadora: Ph.D. Silvia Regina Goi – Prof. Associada DCA/IF/UFRRJ

Dr. Carlos Rodrigues Pereira – Prof. Adjunto DCA/IF/UFRRJ

MSc. Fábio Souto de Almeida – Doutorando do PPGCAF/UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Luiz Felipe Dantas Vergueiro da Cruz e Silvia Maria Marques Vergueiro da Cruz; e ao meu irmão gêmeo: Bruno Marques Vergueiro da Cruz por sempre apoiarem os meus estudos;

À minha Dinda pelos conselhos, carinho e torcida constante;

A toda a minha família pelo amor, carinho e apoio incondicional;

Aos meus amigos do Rio por sempre estarem presentes na minha vida mesmo de longe, me dando carinho e apoio, mesmo nos momentos mais difíceis;

Aos meus queridos amigos Alessandra e Charles, que moram comigo, pelo apoio constante, pelos conselhos e longas conversas;

Às minhas queridas amigas Fernanda e Vanessa por fazerem parte do meu crescimento como pessoa, e por sempre estarem presentes, me estimulando e caminhando junto comigo desde o primeiro período da faculdade;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelos recursos oferecidos para minha formação acadêmica;

Aos professores da UFRRJ, pelo conhecimento e lições de vida que me foram transmitidos;

À Ph.D Silvia Regina Goi pela atenção, carinho, amizade, estímulo e pela orientação durante meu estágio;

À FAPERJ pela bolsa de iniciação concedida;

À Embrapa Agrobiologia, em especial à pesquisadora Rosa M. Pitard, por permitir a realização do experimento deste trabalho;

A todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia pelo apoio e ajuda na condução do experimento;

A todos os meus amigos da UFRRJ, pelos momentos de: alegria, desabafos, compreensão e companheirismo, nesses cinco anos de convivência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO
NODULAÇÃO DE *Mimosa pudica* L. POR BETA-RIZÓBIO ISOLADOS DE DIFERENTES ECOSISTEMAS NO BRASIL.

Este trabalho teve como objetivo, testar a infectividade e efetividade de diferentes isolados caracterizados molecularmente como sendo de beta-rizóbio, inoculados em *Mimosa pudica* L. (Mimosaceae). Os isolados foram obtidos a partir de nódulos coletados em Brasília, DF; Chapadas dos Veadeiros, GO; Chapada Dos Guimarães, MT; Chapada Diamantina, BA. O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard esterilizados, contendo vermiculita e areia como substrato. Foram utilizados 18 isolados de beta-rizóbio e duas testemunhas. Os resultados obtidos indicaram que algumas estirpes foram mais eficientes. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as estirpes BR 3471 e BR 3486 contribuíram para um peso da parte aérea maior do que os demais tratamentos com inoculação. Um dos isolados D23 não promoveu a formação de nódulos, comprovando não ser infectivo. Os demais isolados promoveram a nodulação com eficiência variável. Os isolados D7 apresentou infectividade, formando nódulos, mas não foi efetivo, por não aumentar o peso da planta.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, *Mimosa pudica*, nódulos

ABSTRACT

Nodulation of *Mimosa pudica* L. by beta-rizóbio isolated from different Brazilian ecosystems.

The objective of this work was to test the infectivity and effectivity of different isolates characterized genetically as beta-rizobio, inoculated in *Mimosa pudica* L. (Mimosaceae). The isolates were obtained from nodules collected in Brasilia, DF, Chapada dos Veadeiros, GO, Chapada dos Guimarães, MT, Chapada Diamantina, BA. The experiment was conducted at green house conditions, using Leonard jars filled with a mixture of sand and vermiculite. Eighteen isolates were tested plus a two control treatments. The results obtained showed different among the strains. Differences statistically significant were obtained, and the strains BR 3471 E BR 3486 contributed with an increase in the shoot dry weight. The isolate D 23 was ineffective. The others isolate induced nodule formation with variable effectivity. The isolate D7 showed to be infective but without effectivity because he had no contribution for the shoot or root dry weight.

Key words: Biological nitrogen fixation, *Mimosa pudica*, root nodule

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Objetivos.....	02
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 – Descrição do Gênero <i>Burkholderia</i>	03
2.2 – Ocorrência de <i>Burkholderia</i> spp.....	04
2.3 – Característica do Gênero	04
2.4 – Novas Estirpes de <i>Burkholderia</i> spp. que Nodulam <i>Mimosa</i>	05
2.5 – Distribuição Geográfica de Espécies do Gênero <i>Mimosa</i> que Nodulam com β -rizóbio	06
2.6 – Capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio	07
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	08
3.1 – Eficiência de Isolados Obtidos em Diferentes Regiões do Brasil.....	08
3.1.1 – Preparação dos vasos de “Leonard”	08
3.1.2 – Preparo das sementes.....	09
3.1.3 – Preparo dos inoculantes.....	09
3.1.4 – Montagem e condução do experimento.....	10
3.1.5 – Coleta do experimento.....	10
3.1.6 – Análise estatística.....	10
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1 – Taxa de Pré-germinação.....	11
4.2 – Avaliação dos Parâmetros Analisados.....	11
5 – CONCLUSÕES.....	18
6 – BIBLIOGRAFIA.....	19
ANEXO 1.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vasos de “Leonard” utilizados no experimento.....	09
Figura 2 – Peso da massa seca da parte aérea de <i>Mimosa pudica</i> inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria.....	12
Figura 3 – Vasos de Leonard comparando testemunha sem nitrogênio, testemunha nitrogenada e os tratamentos dos isolados BR3486 (A) e D26(B).....	13
Figura 4 – Peso da massa seca da raiz de <i>Mimosa pudica</i> inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria.....	14
Figura 5 – Raiz nodulada de <i>Mimosa pudica</i>	15
Figura 6 – Número de nódulos radiculares de <i>Mimosa pudica</i> inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria.....	16
Figura 7 – Peso da massa seca de nódulos radiculares de <i>Mimosa pudica</i> inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria.....	17

1 – INTRODUÇÃO

A fixação do nitrogênio apresenta o problema da presença da tripla ligação $N\equiv N$, o que torna este gás extremamente estável a temperatura ambiente (MARIN *et al.*, 1999). O nitrogênio é o elemento de maior demanda da planta e a capacidade de retirar esse elemento do ar torna-se alvo de várias pesquisas em busca da sustentabilidade ambiental e econômica (FARIA & LIMA, 2002). Os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos (plantas e animais) não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (MARIN *et al.*, 1999).

Portanto, a FBN é um processo pelo qual o N_2 atmosférico é reduzido a NH_4^+ e assim fica disponível para ser transferido para compostos contendo carbono, para produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN *et al.*, 2001). Ainda hoje, este processo constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. Dessa forma, a ação de microorganismos fixadores de nitrogênio e desnitrificadores garantem um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados, como por exemplo, o nitrato, que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente (MARIN *et al.*, 1999).

A busca constante de bactérias fixadoras de nitrogênio tem resultado no isolamento de diversos microrganismos diazotróficos e formação de uma vasta coleção de culturas. Consequentemente existe uma grande demanda para a identificação e classificação desses isolados, assim como da verificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para o seu hospedeiro.

Leguminosae é a maior família de plantas e inclui plantas anuais cultivadas, árvores e arbustos. O sucesso do estabelecimento dessas plantas pode ser parcialmente atribuído à habilidade de se associar com bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose, o que lhes assegura total ou parcialmente o nitrogênio necessário para seu crescimento.

Espécies da família Leguminosae que estabelecem simbiose eficiente com bactérias fixadoras de N_2 atmosférico apresentam uma vantagem adicional para plantios de reabilitação de áreas degradadas, considerando-se que em condições tropicais o nitrogênio é, em geral, limitante para o estabelecimento das plantas (FRANCO *et al.*, 1992; FRANCO *et al.*, 1995; FRANCO & FARIA, 1997). Um número considerável de leguminosas conhecidas é capaz de formar nódulos com bactérias fixadoras de nitrogênio e tem potencial para uso em sistemas agroflorestais e para ajudar na manutenção da sustentabilidade dos solos (HERRERA *et al.*, 1993; FRANCO & FARIA, 1997).

A planta *Mimosa pudica* L. (Mimosaceae), com frequência chamada de mimosa, é a mais conhecida das quatrocentas a quinhentas espécies do gênero, devido ao fato de ser a única planta a mover suas folhas como reação ao menor movimento. Esse movimento deve-se às modificações rápidas da pressão interna (pressão de turgescência) das células, ao nível das

articulações situadas na base dos pecíolos e das pinas. Essa modificação da pressão é comandada por uma substância similar a um hormônio nas células. Subarbusto originário do Brasil, também é encontrado multiplicando-se como erva daninha em zonas climáticas similares na África e na Ásia Oriental (BÄRTELS, 2007).

A incorporação de N via FBN aos diferentes ecossistemas do planeta é bastante elevada, representando uma economia substancial de energia fóssil, normalmente empregada na produção de fertilizantes nitrogenados necessários para a agricultura mundial. Para se ter uma idéia, a contribuição da FBN para o total de N introduzido em sistemas agrícolas no mundo é estimada em 65% (REIS *et al.*, 2006).

Sabe-se hoje que muitos gêneros e espécies capazes de realizar a FBN estão distribuídos no ambiente e associados às plantas. Essas associações podem variar em especificidade, estrutura, localização e microrganismo responsável. Existem as bactérias denominadas simbióticas, que são capazes de formar nódulos e pertencem principalmente ao grupo do rizóbio. Há também bactérias que colonizam os tecidos internos das plantas, denominadas de bactérias diazotróficas endofíticas, mas não formam simbiose. Um terceiro grupo forma associações superficiais aos tecidos radiculares, sobrevivem bem no solo e não são caracterizadas como espécies-específicas, sendo denominadas de associativas. Todos esses organismos têm em comum a presença da enzima nitrogenase (REIS *et al.*, 2006).

Até recentemente, os trabalhos publicados indicam que as leguminosas nodulavam apenas com membros da subclasse α -proteobacteria da família Rhizobiaceae. Contudo existem atualmente, vários trabalhos comunicando o isolamento de membros da β -proteobactéria em nódulos de leguminosas. Dentre as β -proteobactérias pode-se citar os gêneros: *Ralstonia*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

Ao longo das últimas duas décadas, a investigação sobre espécies de *Burkholderia* spp. tem expandindo, com a descrição de membros do gênero *Burkholderia*, que são muito abundantes, ocupando diversos nichos ecológicos, desde solos contaminados a seres humanos, sendo um importante componente da comunidade microbiana desses habitats. *Burkholderia* associada a formigas que secretam um agente antifúngico potente foi descrita por SANTOS *et al.* (2004) e foi caracterizada de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* localizada em plantios de eucalipto no Rio de Janeiro.

1.1 – Objetivos

Este trabalho teve como objetivo, testar a infectividade e efetividade de 18 isolados caracterizados molecularmente como sendo de beta-rizóbio, inoculados em *Mimosa pudica*.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Descrição do Gênero *Burkholderia*

Em 1942, Walter H. Burkholder descreveu um dos primeiros gêneros de *Burkholderia* spp., *Phytomonas caryophylli*, mais tarde conhecida como *Pseudomonas caryophylli*. Em 1949, ele também descreveu uma bactéria fitopatogênica, que causava podridão na casca das cebolas conforme relatado por produtores hortícolas no Estado de Nova York em meados dos anos 1940 e deu a espécie o nome 'cepacia', ou seja, derivados de 'cebola', foi mais tarde conhecida como *Pseudomonas cepacia* (COMPANT *et al.*, 2008).

Burkholderia spp. foi por muitos anos incluída no gênero *Pseudomonas* devido à sua ampla e vaga definição fenotípica. No entanto, análises de hibridação rRNA-ADN durante o início dos anos 1970 indicaram considerável diversidade genética entre os membros desse gênero, que foi assim dividido em cinco grupos (REIS *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2008). Posteriormente análises genotípicas confirmaram que estes cinco grupos são apenas remotamente relacionados uns aos outros. Consequentemente, *Pseudomonas* foi o único gênero aceito ao grupo I, contendo espécies como *Pseudomonas aeruginosa* (PERIN *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2008).

Em 1992, sete espécies pertencentes ao grupo II (*Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas pickettii*, *P. cepacia*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *P. caryophylli*) foram transferidos para o gênero *Burkholderia* (PERIN *et al.*, 2006), que pertencem ao subgrupo β -3 da Beta-proteobacteria (COMPANT *et al.*, 2008). Um número considerável de espécies foi incluído no gênero *Burkholderia*, nos últimos anos. Muitas destas alterações envolvem *Burkholderia cepacia* que em vários estudos taxonômicos polifásicos indicaram que estirpes identificadas como *B. cepacia* representam um 'complexo', composto de inúmeras espécies similares fenoticamente, chamadas de genomovares (PERIN *et al.*, 2006). Este grupo, coletivamente referido como o complexo *B. cepacia*, atualmente é constituído por nove espécies, incluindo *B. cepacia* (genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III), *Burkholderia stabilis* (genomovar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genomovar V), *Burkholderia dolosa* (genomovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomovar VII), *Burkholderia anthina* (genomovar VIII) e *Burkholderia pyrrocinia* (genomovar IX) (PERIN *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2008).

Muitas outras espécies de *Burkholderia* foram descritas desde a descoberta de *B. cepacia* por W.H. Burkholder e existem atualmente mais de 40 espécies descritas. A maioria destas espécies interage com plantas e podem ser fitopatógenos, endosimbiontes em fungos fitopatogênicos. Contudo, muitas podem ser neutras ou benéficas para as plantas e têm uma íntima associação com seus hospedeiros (COMPANT *et al.*, 2008).

Várias espécies do gênero *Burkholderia* podem induzir doenças nas plantas. A conhecida bactéria patógena *B. cepacea* é causadora de podridão em casca de cebola (PERIN *et al.*, 2006). Como espécies fitopatogênicas, citam-se: *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia glumae* e *Burkholderia androponis*. Possivelmente, no futuro outras espécies irão se correlacionar também com os efeitos negativos sobre as plantas. Na verdade, o papel ecológico de algumas *Burkholderia* spp., tais como *Burkholderia glathei*, *Burkholderia graminis*, *Burkholderia phenazinium*,

Burkholderia caribensis, *Burkholderia caledonica*, *Burkholderia hospita*, *Burkholderia terricola* e *Burkholderia saccharii*, continua a ser largamente desconhecido neste momento (COMPANT *et al.*, 2008).

Alguns fungos fitopatogênicos podem conter membros do gênero *Burkholderia* como endosimbiontes. Por exemplo, *Burkholderia fungorum* foi isolado do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que pode induzir doenças nas árvores. Semelhante a esta associação, *Burkholderia sordidicola* foi detectada no interior do fungo fitopatogênico *Phanerochaete sordida*, que habita ramos caídos de árvores (COMPANT *et al.*, 2008).

2.2- Ocorrência de *Burkholderia* spp.

Aqui no Brasil, os primeiros isolados de *Burkholderia* spp. foram obtidos de arroz (BALDANI, 1996). Uma análise dos isolados obtidos de cana-de-açúcar mostraram a existência de uma espécie de *Burkholderia* colonizando esta planta, a qual foi provisoriamente denominada de *B. tropicalis*. Isolados com características semelhantes a esta espécie foram obtidos de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar cultivadas em solo oriundo de canavial e de canas adultas cultivadas na Austrália (BODDEY *et al.*, 1998).

Neste gênero, inúmeras bactérias têm sido isoladas de vários ecossistemas e com um número variado de atividades. Uma das últimas seria a atividade antifúngica do isolado MP-1 contra fungos fitopatogênicos (SOPHEARETH *et al.*, 1999). Recentemente, juntamente com outras bactérias diazotróficas, *Burkholderia* spp. foi isolada do solo da rizosfera de plantas de arroz na Coreia (KANG, 2006).

Outra característica particular deste gênero é ter sido encontrado no interior de esporos e hifas de fungos micorrízicos e possuir 2 sistemas de transporte de fósforo, atuando quando a bactéria está dentro da hifa do fungo (RUIZ-LOZANO & BONFANTE, 1999).

Em relação às espécies de *Burkholderia* spp. associadas com a rizosfera, nas espécies não patogênicas, *B. graminis* é uma rizobactéria comum em milho, pastagem e trigo na Austrália e França (PERIN *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2008). *Burkholderia unamae* está associada com milho, cana-de-açúcar e café, *B. ambifaria* com ervilha nos E.U.A., *B. silvatlantica* é um habitante comum da rizosfera de milho e cana-de-açúcar cultivadas no Brasil e *B. caledonia* foi isolado da rizosfera de videira (*Vitis* sp.) na Escócia (COMPANT *et al.*, 2008).

Plantas podem ser colonizadas por mais de uma espécie do gênero *Burkholderia*: *Burkholderia vietnamiensis*, que foi descrita pela primeira vez na rizosfera de arroz no Vietnã, foi isolada, juntamente com outras espécies de *Burkholderia* a partir da rizosfera de milho e café no México. Além disso, um estudo recente sobre a rizosfera de *Sphagnum* em zonas boreais e tundras na Rússia, Canadá e Estônia, foi descoberta associações semelhantes entre plantas e várias *Burkholderia* spp. Essas associações foram relatadas em mais de 30 espécies de plantas (COMPANT *et al.*, 2008).

2.3 - Característica do Gênero

Em relação a *B. brasilensis*, o uso do meio semi-sólido JMV, com manitol como fonte de carbono e pH ao redor de 4,5 tem permitido o isolamento desta bactéria a partir da maioria das plantas citadas acima. As células são encapsuladas e apresentam tamanho maior do que as demais bactérias endofíticas. As colônias em meio JMV são de pequenas a médias, úmidas, esbranquiçadas e de centro amarelado. Na presença de extrato de levedura (20 mg/l) ocorre

um aumento da atividade da nitrogenase e é capaz de tolerar alta concentração de sacarose (10%) quando crescida em no meio de cultura (BALDANI, 1996).

Em cana-de-açúcar, estudos realizados onde foram acompanhados os processos de infecção, colonização por bactérias diazotróficas endofíticas, a distribuição e densidade de pêlos radiculares, mostraram variações nas diferentes zonas da raiz (GOI *et al.*, 1998). A estirpe MEX 77 de *Azospirillum lipoferum* promoveu um aumento dos pêlos radiculares de tamanho maior enquanto que as plantas inoculadas com a estirpe PAL 5 de *Acetobacter diazotrophicus* apresentaram uma maior densidade de pêlos na zona proximal. As menores densidades de pêlos radiculares foram encontradas nos tratamentos inoculados com as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Burkholderia brasilensis*. As estirpes PAL 5 e Mex 77 também contribuíram para um aumento no peso da raiz fresca quando comparada com as raízes da planta controle.

Esse aumento de densidade de pêlos radiculares pode ocorrer pela produção de hormônios de crescimento, tais como o ácido indolilacético (AIA) e nesse sentido além da capacidade de fixar o N₂ atmosférico, essas bactérias poderiam promover o crescimento da planta.

Várias estirpes são conhecidas por aumentar a resistência às doenças nas plantas, contribuir para um melhor manejo da água, melhorar a fixação de nitrogênio e adaptação a pressões ambientais. Essa característica do gênero tem estimulado um interesse crescente na utilização de isolados de *Burkholderia* na agricultura. Devido ao fato de algumas espécies / isolados serem oportunistas ou patógenos causadores de doenças em humanos, animais ou plantas, qualquer desenvolvimento de produtos agrícolas e / ou aplicações biotecnológicas utilizando germoplasma de *Burkholderia* deve incluir uma avaliação rigorosa dos riscos potenciais (COMPANT *et al.*, 2008).

2.4 – Novas Estirpes de *Burkholderia* spp. que Nodulam *Mimosa*.

Embora fosse generalizadamente aceito por muitos anos que legumes nodulavam exclusivamente com membros da família Rhizobiaceae na subfamília α -proteobacteria (incluindo o gênero *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) (SPRENT, 2001; SAWADA *et al.*, 2003;), recentemente vários trabalhos publicados relatam que membros da β -proteobacteria, foram isolados de nódulos. Estes trabalhos incluem *Burkholderia tuberum*, estirpe STM678 e *Burkholderia phymatum* estirpe STM815 (originalmente isolada de *Aspalathus carnosa* no Sul da África e *Macherium lunatum* na Guiana Francesa, respectivamente (MOULIN *et al.*, 2001), *Ralstonia taiwanensis* (isolada de *Mimosa pudica* em Taiwan e Índia) e *Mimosa diplotricha* em Taiwan (CHEN *et al.*, 2001; VERMA *et al.*, 2004) e renomeada de *Cupriavidus taiwanensis* (VANDAMME & COENYE, 2004) e várias estirpes de *Burkholderia* isoladas de *Mimosa casta*, *Mimosa pigra*, *M. pudica* e *Abarema macrademia* no Panamá (BARRETT & PARKER, 2005).

CHEN *et al.* (2003), mostraram que o gênero *Mimosa* tem afinidade particular por β -rizóbio. Nesse caso, dos 190 isolados, dos nódulos de *M. pudica* e *M. diplotricha* em Taiwan, a maioria dos isolados foi identificado como β -rizóbio, e estes consistiam na maior parte de *C. taiwanensis* (>93%), 2 estirpes de *Burkholderia caribensis* (espécie previamente descrita que não era conhecido como estirpe que nodulava legumes) e o restante constituía o grupo de α -rizóbio convencional (*Rhizobium* e *Sinorhizobium*) (VANDAMME *et al.*, 2002). Embora esses β -rizóbio pareçam ser o simbionte predominante de *Mimosa* os α -rizóbio clássicos também são capazes de nodular *Mimosa* (CHEN *et al.*, 2003).

As quatro espécies de *Mimosa* testadas, por CHEN *et al.* (2005a), nodularam com as cinco estirpes representativas. Os nódulos produzidos em cada caso eram rosa, que indicam a presença de leghemoglobina e sugerem que as bactérias estavam efetivamente fixando nitrogênio. Para *M. pudica*, a fixação biológica de nitrogênio foi confirmada pela redução de acetileno. Em *M. diplotricha* e *M. acutistipula* também foram produzidos nódulos rosa, porém o número dos nódulos era geralmente menor que aqueles em *Mimosa pudica*.

Em relação ao número de nódulos, SIQUEIRA (2005), encontrou um número elevado de nódulos (mais de 200) em *Mimosa bimucronata*, produzidos pelas estirpes BR3461 e BR3470 de *Burkholderia* spp. Anteriormente, trabalhando com outra estirpe de *Burkholderia* spp. (IBRC 199 e 200), PATREZE & CORDEIRO (2004) também encontraram plantas com um número elevado de nódulos em *M. bimucronata*. Como normalmente as leguminosas arbóreas não apresentam um número muito grande de nódulos em suas raízes, sugere-se que essas estirpes sejam mais eficientes no processo de infecção e colonização. Os nódulos encontrados por SIQUEIRA (2005), também eram rosa no interior indicando a presença de leghemoglobina.

Embora estudos genéticos tenham identificado genes *nifH* e *nodA* nas estirpes de *Burkholderia* STM678 e STM815, existem poucos estudos de fisiologia, bioquímicos e de microscopia que evidenciem a natureza simbiótica da interação.

CHEN *et al.* (2005a), testando 20 estirpes de bactérias do Brasil e Venezuela, comparando a sequência de genes 16S rRNA com genes de estirpes referência, mostrou que eram membros do gênero *Burkholderia*. Em adição, 5 estirpes foram capazes de nodular outras *Mimosa* spp., e todas produziram nódulos em *M. pudica*, com atividade da nitrogenase e estrutura típica de simbiose efetiva, confirmando fortemente que essas estirpes de *Burkholderia* formam simbiose efetiva com as leguminosas.

ELLIOTT *et al.* (2009), estudou as posições filogenéticas de vários rizóbios e foram determinadas através da comparação de sequências dos seus genes 16S rDNA e *NodA*. A divergência entre α e β -proteobacteria é claramente observado na análise das sequências 16S rDNA, com mais uma aparente divergência dentro dos β -rizóbios entre *Burkholderia* e *Cupriavidus*. Em isolados obtidos de nódulos de *M. diplotricha* na Papua Nova Guiné foi identificada mais de uma estirpe de *B. mimosarum* (NGR190). Considerando a sequência de 16S rDNA, o isolado NGR193A obtido de nódulos de *Mimosa pudica* na Papua Nova Guiné, foi colocado no gênero *Cupriavidus*, apesar de não ter sido suficientemente semelhante a qualquer espécie (incluindo *C. taiwanensis*). *Cupriavidus taiwanensis* também foi isolado de mimosas invasivas (*M. pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra*).

2.5 – Distribuição Geográfica de Espécies do Gênero *Mimosa* que Nodulam com β -rizóbio

Poucas espécies são nativas da Ásia, como *Mimosa himalayana*, e África, sendo a maioria das 480 espécies de *Mimosa* nativa da América Central e América do Sul (BARNEBY, 1991) com a Região do Cerrado do Brasil central sendo o maior centro de diversidade do gênero.

Até hoje, a maioria dos isolados de β -rizóbio foram obtidos de *Mimosa* na Ásia, já nas Américas foram poucos (CHEN *et al.*, 2005b). No estudo desenvolvido por CHEN *et al.* (2005a), todos os isolados examinados que foram coletados nas Américas, eram β -rizóbio, esses foram coletados na Mata Atlântica e em florestas inundáveis do Rio Orenoco.

Os dados de CHEN *et al.* (2005a), juntamente com os resultados apresentados por BARRETT & PARKER (2005), indicam que o tipo β -rizóbio seria o que domina a nodulação

da *Mimosa* spp. Embora, no trabalho realizado por ELLIOTT *et al.* (2009), estirpes de α -rizóbio também nodularam eficazmente em *Mimosa*.

2.6 – Capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio

Com relação à capacidade de fixação biológica de nitrogênio, alguns estudos de inoculação em arroz mostraram-se promissores quando inoculadas com estirpes de *B. vietnamensis* (11 a 20%) em experimento de vasos (BALDANI *et al.*, 2000).

Em leguminosas, CHEN *et al.* (2005a), demonstraram que estirpes de *Burkholderia* foram capazes de nodular outras *Mimosa* spp., e todas produziram nódulos em *M. pudica* com atividade da nitrogenase.

PATRESE & CORDEIRO (2004) também identificaram atividade de redução de acetileno em *M. bimucronata* inoculada com *Burkholderia* spp. estirpes IBRC 199 e 200.

A descoberta de ELLIOTT *et al.* (2009), que os β -rizóbio são tão dominante como simbioses no gênero *Mimosa*, e particularmente que esta dominância pode ser reduzida pelo N contido no solo, indicam que esse grupo também pode ser dominante em outros gêneros, em outros ambientes e, portanto, os conceitos "tradicionais" sobre taxonomia / filogenia dos rizóbios em relação às plantas hospedeiras primeiro noduladas em membros da família Leguminosae pode ser repensado.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Eficiência de Isolados Obtidos em Diferentes Regiões do Brasil

A Região do Cerrado foi considerada o maior centro de diversidade de *Mimosa* spp., então decidiu-se realizar uma excursão para coletar nódulos e solo em diferentes estados do Brasil.

A partir de nódulos coletados em Brasília, DF; Chapadas dos Veadeiros, GO; Chapada dos Guimarães, MT; e Chapada Diamantina, BA; foram obtidos isolados, que foram testados em vasos de Leonard, utilizando a espécie *M. pudica*.

Após o isolamento dos nódulos, as estirpes dos isolados foram purificadas e testadas molecularmente para saber se pertenciam ao grupo de β -proteobactéria. Dos isolados obtidos, foram utilizados 18, em experimento conduzido em casa de vegetação, em condições estéreis, com as plantas crescidas em vasos de Leonard.

3.1.1 – Preparação dos vasos de “Leonard”

O vaso de “Leonard” (Figura 1) é formado por uma garrafa cortada, na sua parte inferior, disposta em posição invertida, dentro de um “copo” de diâmetro maior (base de outra garrafa). A areia e vermiculita (2/1 v/v) (FARIA, 2002) são colocadas dentro da garrafa e a seguir tampa-se esta garrafa com uma tampa feita com tecido de algodão, com o objetivo de impedir a passagem do substrato e permitir a ascensão da solução nutritiva adicionada ao “copo”. Após o preenchimento dos vasos com substrato faz-se a “saia” do vaso, sendo esta feita de saco de papel de 2 kg e barbante, e a seguir, coloca-se a tampa do vaso, feita com jornal e barbante. A “saia” e a tampa são utilizadas para evitar contaminação. Depois de preparados os vasos foram colocados duas vezes em autoclave a 120°C por 1 hora a 1,5 atm de pressão (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).



Figura 1 – Vasos de “Leonard” utilizados no experimento.

3.1.2 – Preparo das sementes

As sementes de *M. pudica* foram submetidas ao processo de escarificação, permanecendo 10 minutos em ácido sulfúrico, seguido de 10 lavagens abundantes com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas superficialmente permanecendo 30 segundos em álcool 96% para a quebra da tensão superficial e 3 minutos em peróxido de hidrogênio, seguido de 10 lavagens abundantes em água destilada esterilizada. As sementes foram colocadas para pré-germinar em placas de petri, com 20ml de meio de cultura agar-água (1%) e a seguir foram colocadas na câmara de germinação à temperatura ambiente (25 – 30°C) até que houvesse a emissão dos cotilédones (PERIN, 2007).

3.1.3 – Preparo dos inoculantes

Uma colônia (pura) de cada isolado foi inoculada separadamente em tubos de vidro com capacidade para 125mL, contendo 50mL de meio de cultura líquida 79 (Anexo 1) (FRED & WAKSMAN, 1928), acrescidos de 0,1% de agar. Os tubos foram incubados por 4 dias à temperatura ambiente em agitador rotativo constante de 150 rpm com o objetivo de promover e acelerar a multiplicação.

A inoculação foi realizada, após a transferência das plântulas de *M. pudica* para os vasos, com uso de pipeta de precisão (1mL de inoculante por plântula).

3.1.4 – Montagem e condução do experimento

O experimento foi montado em casa de vegetação, em condições estéreis, da Embrapa Agrobiologia, nos meses de abril a junho de 2007.

Foram utilizados 20 tratamentos (T – Testemunha sem inoculação, TN – testemunha nitrogenada, 18 isolados de β -proteobacteria), com 4 repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso.

As estirpes dos tratamentos BR3471 e BR3486 são consideradas padrão para *Burkholderia* e originalmente eram indicadas para inoculação de leguminosas do gênero *Mimosa*, como sendo *Rhizobium* sp. As estirpes padrão testadas foram: *Burkholderia plymatum* – STM815 (BR3486) e *Cupriavidus taiwanensis* – LMG19424 (BR3471).

As estirpes precedidas de “BR” pertencem ao Banco de estirpes da Embrapa Agrobiologia e as precedidas de “D” pertencem ao Banco da University of Dundee.

Em cada vaso foram plantadas 3 plântulas e após inoculação cobriu-se o substrato com areia estéril. Foi realizado um desbaste 15 dias após o plantio, restando somente 1 plântula por vaso.

Após a queda dos cotilédones, as testemunhas nitrogenadas receberam 500 μ L de nitrogênio na 1ª semana; 750 μ L na 2ª semana; e 1mL na 3ª semana em diante.

O fornecimento de nutrientes às plantas foi realizado quinzenalmente, na forma de solução nutritiva de GUZMAN & DÖBEREINER (1968):

KCl, 2mM; K₂HPO₄, 0,3mM; KH₂PO₄, 0,7mM; CaSO₄.5H₂O, 0,3 μ M; ZnSO₄.7H₂O, 0,7 μ M; MnSO₄, 1 μ M; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0,002 μ M; H₃BO₃, 11,5 μ M; FeSO₄.7H₂O, 17,9 μ M; ácido cítrico, 26 μ M; no volume de 0,25 L por vaso.

3.1.5 – Coleta do experimento

A coleta foi realizada 54 dias após o plantio. A parte aérea e a raiz das plantas foram acondicionadas em sacos de papel, separadamente, e deixados em estufa a 65°C durante 48 horas para proceder à avaliação do peso da massa seca da parte aérea e da raiz. Os nódulos foram contados e secos em estufa para pesagem.

3.1.6 – Análise estatística

Para a análise estatística, foi feita a conversão dos dados de parte aérea e raiz para \sqrt{x} e para peso e número de nódulos, foi feita a conversão para $\sqrt{x+1}$. Foi utilizado o programa SAEG e aplicado o teste de Tukey para comparar as médias.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Taxa de Pré-germinação

Após a escarificação e esterelização das sementes, as mesmas foram colocadas para germinar (306 sementes) em placa de petri, com 20 mL de meio agar-água (1%) e obteve-se 291 sementes pré-germinadas.

A taxa de pré-germinação das sementes foi eficiente (95%) e constatada em 36 horas.

4.2 – Avaliação dos Parâmetros Analisados

Para o peso da massa seca da parte aérea (Figura 2) o maior valor foi obtido para a testemunha nitrogenada (TN), indica que nenhuma das estirpes testadas foram suficientes para otimizar o crescimento da planta em termos de fixação biológica de nitrogênio. Mas os aumentos de peso em relação à testemunha sem inoculação e sem nitrogênio mineral (T), indicam que as estirpes inoculadas fixaram nitrogênio em associação com a planta, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos com inoculação e T. Essa seria uma das indicações que esses nódulos foram efetivos.

As estirpes dos tratamentos BR3471 e BR3486, que são estirpes padrão, contribuíram para um peso da parte aérea maior do que os demais tratamentos com inoculação de outros isolados (Figura 2).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas para o peso da massa seca da parte aérea, os valores médios também foram maiores que as testemunhas sem nitrogênio para os isolados D26, D11, D18, D10, D41 e D13, indicando que os isolados contribuíram com o nitrogênio fixado para incremento do peso das plantas.

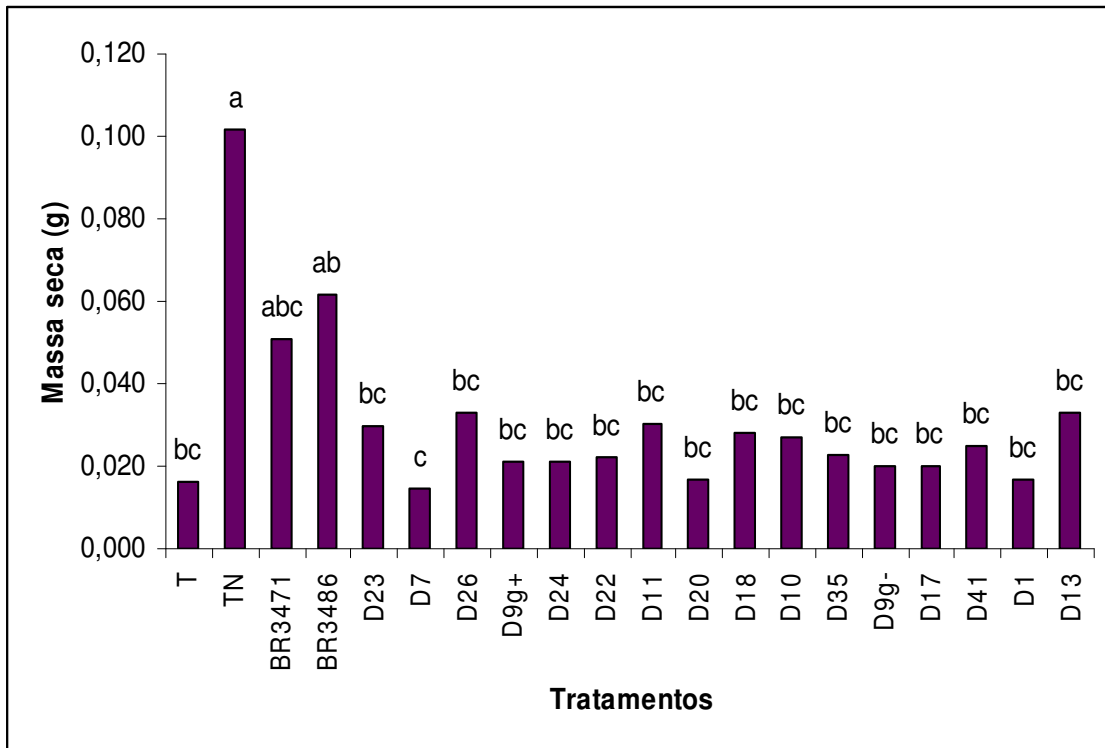


Figura 2 – Peso da massa seca da parte aérea de *Mimosa pudica* inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria. Médias com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Na Figura 3, observa-se um crescimento maior da parte aérea da estirpe BR3486 (A) e um crescimento menor da parte aérea da estirpe D26 (B), ao lado dos tratamentos testemunha sem nitrogênio e testemunha nitrogenada.

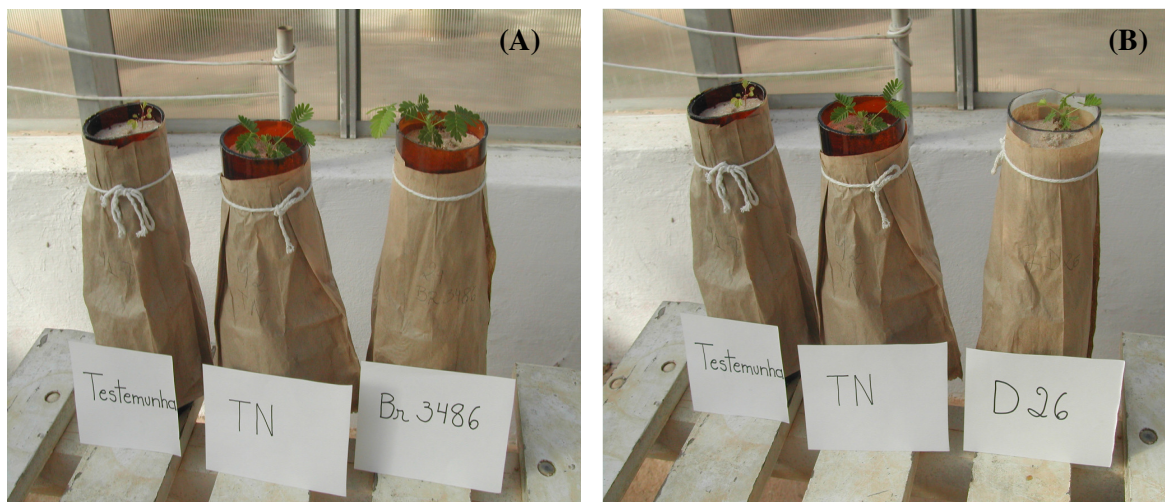


Figura 3 – Vasos de Leonard comparando testemunha sem nitrogênio, testemunha nitrogenada e os tratamentos dos isolados BR3486 (A) e D26 (B).

Com relação ao peso da massa seca de raiz (Figura 4), foram observadas diferenças significativas somente entre a testemunha com nitrogênio e os demais tratamentos, com exceção do tratamento BR3486. Contudo, visualmente esses inoculados promoveram algumas modificações no sistema radicular. Na estirpe D13 as raízes eram mais curtas, finas e com um número maior de raízes secundárias e terciárias, que indicam um possível efeito de bactérias fixadoras de nitrogênio na morfologia da raiz, como foi encontrado por GOI *et al.* (1998) com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, associadas a gramíneas e que teriam efeito de promotoras de crescimento.

As testemunhas não nodularam, o que indica que não houve contaminação no experimento e que os nódulos de cada vaso foram resultantes dos isolados inoculados.

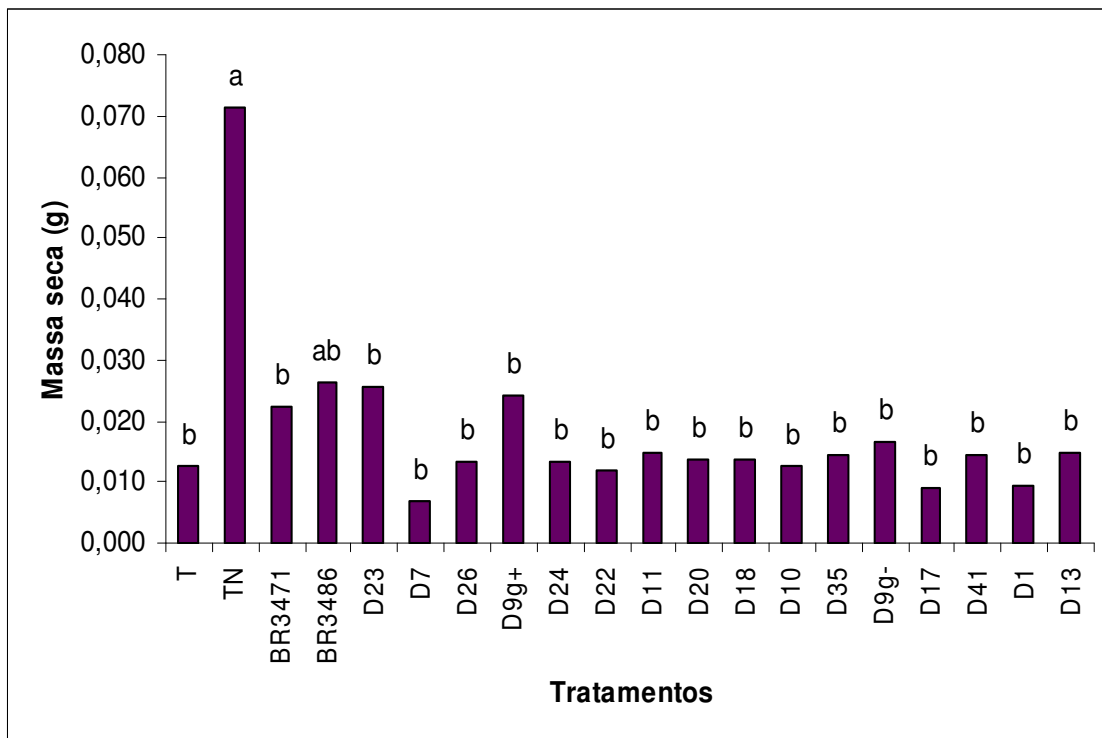


Figura 4 – Peso da massa seca da raiz de *Mimosa pudica* inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria. Médias com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Os nódulos coletados da raiz de *M. pudica* foram contados e secos em estufa (65°C) para pesagem (Figura 5).



Figura 5 – Raiz nodulada de *Mimosa pudica*

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para número de nódulos (Figura 6). O isolado que promoveu a formação de um maior número de nódulos foi o D13. Nesse tratamento, os nódulos embora em número elevado, eram pequenos, e isso se refletiu no valor de massa seca de nódulos (Figura 7).

O tratamento D35 apresentou um número de nódulos elevado, porém estes eram escuros e pequenos e possivelmente isso contribuiu para um baixo peso da massa seca de nódulos (Figura 7), parte aérea (Figura 2) e raiz (Figura 4).

O isolado D23 não promoveu a formação de nódulos, indicando não ser infectivo para essa espécie.

Embora os isolados BR3471 e BR3486, que são as estirpes padrão, tenham contribuído para um aumento maior do peso da massa seca da parte aérea, não apresentaram um maior número de nódulos e nem peso de nódulos, indicando serem mais eficientes. Porém SIQUEIRA (2005) encontrou um elevado número de nódulos inoculado com BR3470 e BR3461 em *M. bimucronata*.

O isolado D22 apresentou um número significativo de nódulos e observou-se que foram pequenos, arredondados e mais escuros externamente.

Os tratamentos D35, D13 e D11 obtiveram números de nódulos mais elevados. O isolado que contribuiu para um peso maior de nódulos foi o D11. Porém, os valores dos pesos

da massa seca da parte aérea e raiz foram baixos. Comparando o número de nódulos deste trabalho com os dados publicados por ELLIOTT *et al.* (2009), observa-se que para os isolados D35 e D13 esses valores foram aproximadamente o dobro (D35) e o triplo (D13) do número nódulos citados por esse autor para *M. pudica*.

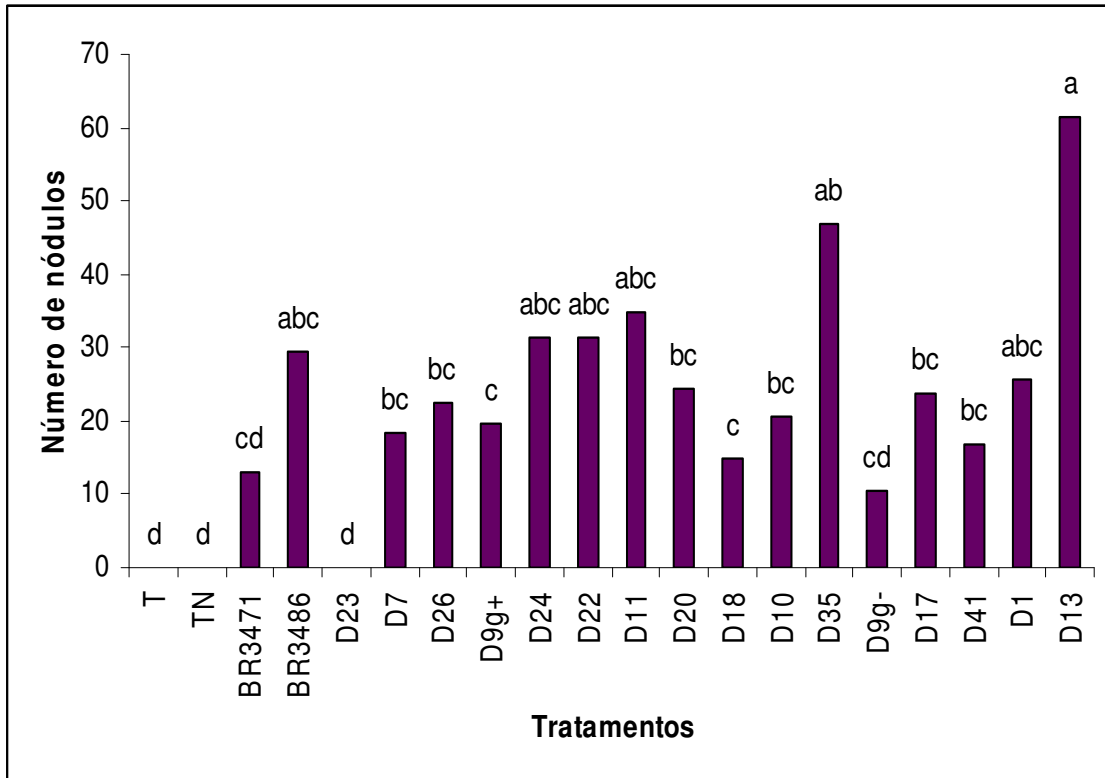


Figura 6 – Número de nódulos radiculares de *Mimosa pudica* inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria. Médias com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

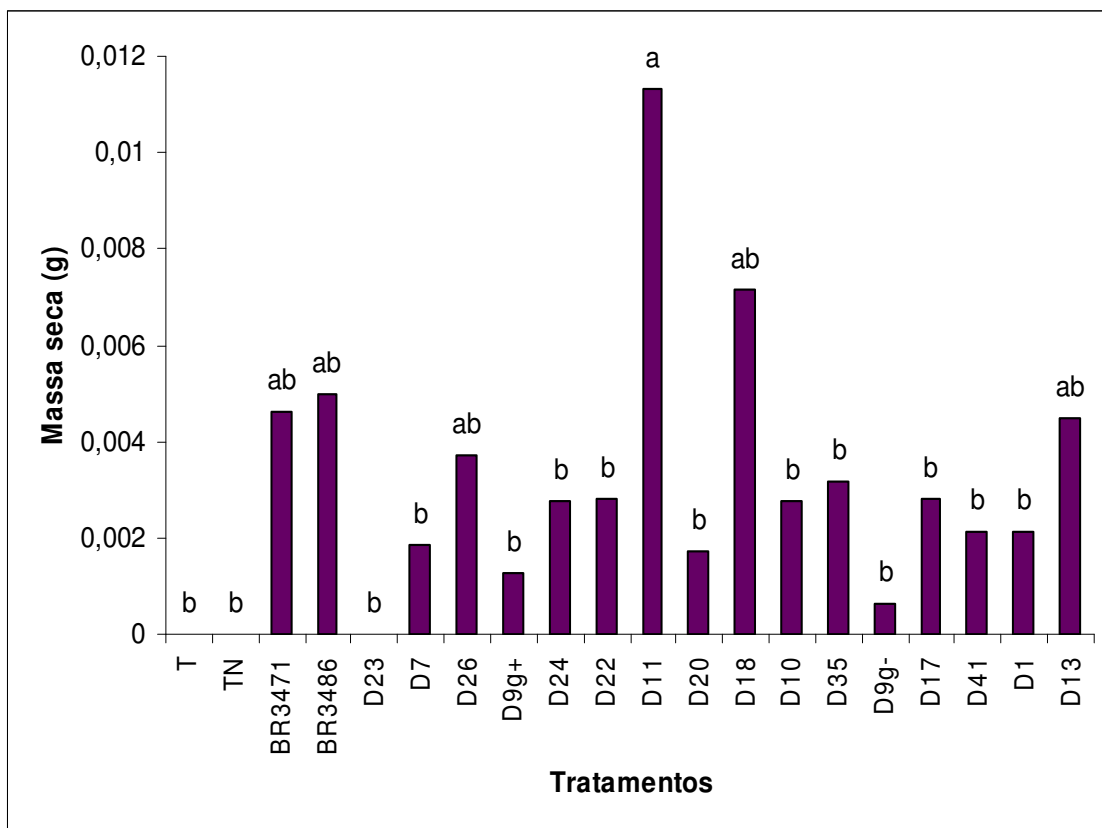


Figura 7 – Peso da massa seca de nódulos radiculares de *Mimosa pudica* inoculada com diferentes isolados de β -proteobacteria. Médias com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

5 – CONCLUSÕES

A estirpe D7 apresentou infectividade, formando nódulos, mas não foi efetiva, por não aumentar o peso da planta.

A estirpe do tratamento D23 não foi infectiva.

A estirpe D13 e D35 induziram a formação de um número elevado de nódulos mas que não foram efetivos.

Os isolados BR3471 e BR3486 (estirpes padrão) foram mais eficientes em contribuir para o acúmulo de massa seca da parte aérea de *M. pudica*.

6 – BIBLIOGRAFIA

BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, UFRRJ, 234 p. Tese de Doutorado, 1996.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30 (5-6), p.485-491, 2000.

BARNEBY, R. C. *Sensitivac censitae*: a description of the genus *Mimosa linnacus* (Mimosaceae) in the new World. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.65, p.1-835, 1991.

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, p.57-65, 2005.

BÄRTELS, A. **Guia de Plantas Tropicais: plantas ornamentais, plantas úteis, frutos exóticos**. Rio de Janeiro, Lexikon, 379p, 2007.

BODDEY, L. H; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. Fertbio98. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma. Caxambu, 11 a 16 de Outubro de 1998. Resumo 772, p. 805, 1998.

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

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

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; 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, n.11, p.7461-7471, 2005a.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; YANG, S. Z.; SPRENT, J. I. β -Rhizobia *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v.168, p.661-675. 2005b.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural Environment. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology**. V.32, p. 607- 626, 2008.

ELLIOTT, G. N.; CHOU, J. - H.; CHEN, W. - M.; BLOEMBERG, G.V.; BONTEMPS, C.; MARTÍNEZ - ROMERO, E.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, p.762-778, 2009.

FARIA, S. M. Obtenção de estirpes de rizóbio eficiente na fixação de nitrogênio para espécies florestais. Série DOC 134. Embrapa Agrobiologia. 19p. 2002.

FARIA, S. M. & LIMA, H. C. Levantamento de nodulação em leguminosas arbóreas e arbustivas em áreas de influencia da Mineração Rio do Norte – Porto Trombetas/ PA. Série DOC 159. Embrapa Agrobiologia, 32p. 2002.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. Revegetação de solos degradados. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 11p. 1992.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils, Ed: Evans, D. O. & Szott, L. T., p.313-320, 1995.

FRANCO, A. A. & FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p.897-903, 1997.

FRED,E.B. & WALKSMAN,S.A.. Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to the Microorganisms of the Soil. New York: Mc-Graw-Hill Book Company, 1928.

GOI, S.R.; SILVA, R. A.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Influência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na formação de pêlos radiculares em cana-de-açúcar. *Fertbio98. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma*. Caxambu, 11 a 16 de Outubro de 1998. Resumo, p.428-432, 1998.

GUZMAN, I. & DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four crossinoculated tropical legumes. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4. Anais..Porto Alegre: UFRGS, p. 46-57, 1968.

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, n. 1, p. 129-133, 1993.

KANG, U. G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophic bacterial species from paddy rice in Korea. 18th World Congress of Soil Science, Philadelphia, Pennsylvania, USA, p.140-6, 2006.

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, RJ. Embrapa Agrobiologia. Série DOC 091. 34p, 1999.

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

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

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. R. O Gênero *Burkholderia*: um Importante Componente da Comunidade Microbiana. Seropédica, RJ. Embrapa Agrobiologia. Série DOC 219. 32p, 2006.

PERIN, L. Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatlantica*. Seropédica, UFRRJ. 88p. Tese de Doutorado. 2007.

RAVEN, P.; EVETR, R. R.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.307-311. 2001.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. VI – Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. SBCS, Viçosa. **Nutrição Mineral de Plantas**, (ed. FERNANDES, M. S) 432p, 2006.

RUIZ-LOZANO, J. M.; BONFANTE, P. Identification of a putative P-transporter operon in the genome of a *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Journal Bacteriology**, v. 181, n. 13, p. 4106-4109, 1999.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R.I.; Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, v. 239, p. 319-323, 2004.

SAWADA, H. L. D.; KUYKENDALL, D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen fixing legume symbionts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p.155-179, 2003.

SIQUEIRA, A. B. P. Efeito de Diferentes Fontes e Níveis de Nitrogênio no Crescimento Inicial de *Mimosa bimucronata* (DC.) *kuntze* e de *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae). Seropédica, UFRRJ, 38p. Monografia, 2005.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Methods in legume *Rhizobium* technology**. Maui: NifTAL, 367p, 1985.

SOPHEARETH, R J.; JUNG, P. M.; WOONG, K. Y.; YOUNG, K. K. Isolation and Characterization of antifungal substances from culture broth of *Burkholderia* sp. **Journal Bacteriology**, v.18, n. 13, p.4106-4109, 1999.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Royal Botanic Gardens, Kew, London.146p., 2001.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; 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. & COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.2285-2289, 2004.

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**, v. 50, p.313-322, 2004.

ANEXO 1

MEIO 79

Manitol (*)	10g
K ₂ HPO ₄ (10%)	1 ml
KH ₂ PO ₄ (10%)	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O(10%)	2ml
NaCl (10%)	1 ml
Extrato de levedura (**)	0,4 g
Azul de bromotimol (0,5%) em 0,2N de KOH	5ml

Ajustar pH para 6,8-7,0 com KOH sol. 10%;

Completar o volume para 1000 ml com água destilada;

Adicionar 15 g de Agar.

* Usar açúcar cristal para *Rhizobium* de crescimento rápido.

** Pode ser substituído por 100 ml de extrato de levedura líquido por meio de cultura.