

Andressa Danielli Canei

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS AUTÓCTONES DE ÁREAS DE
RESTINGA EM LEGUMINOSAS NATIVAS DO PARQUE ESTADUAL DO
RIO VERMELHO, FLORIANÓPOLIS, SC**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Cláudio R.F.S.
Soares

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Dutra de
Armas

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Canei, Andressa Danielli

Eficiência simbiótica de rizóbios autóctones de áreas de restinga em leguminosas nativas do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC / Andressa Danielli Canei ; orientador, Cláudio R. F. S. Soares; coorientador, Rafael Dutra de Armas SC, 2017.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. bactérias fixadoras de nitrogênio. 3. Mimosa bimucronata. 4. Dalbergia ecastophyllum. 5. Sophora tomentosa. I. Soares, Cláudio R. F. S. . II. de Armas, Rafael Dutra. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

**Eficiência simbiótica de rizóbios autóctones de
áreas de restinga em espécies de leguminosas
nativas do Parque Estadual do Rio Vermelho, SC'**

por

Andressa Danielli Canei

Dissertação julgada e aprovada em 22/02/2017, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



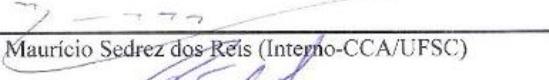
Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Souza Soares (Presidente-CCB/UFSC)



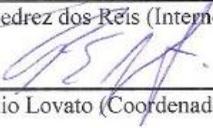
Prof. Dr. Álvaro Luiz Mafra (Externo-CAV/UEDESC)



Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte (Externo-CCB/UFSC)



Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2017

In memoriam a Diana Marcela Londoño Morales

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a todo apoio e amizade dos meus colegas do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos da UFSC (LMPB), especialmente a Emanuela Pille, Anabel González Hernández, Ana Carolina Peixoto, Beatriz Garcez e ao Ednilson Meyer, que estiveram comigo desde o início e que cujo companheirismo fizeram toda a diferença nessa jornada.

Em especial, ao meu orientador Cláudio R.F.S. Soares pelos ensinamentos, paciência e amizade de sempre.

A Alice Damiani e ao Luiz de Souza, pela ajuda e seriedade na condução dos experimentos, sem os quais dificilmente teria finalizado a tempo esse trabalho.

Ao meu noivo Mauricio Dal Pont, que sempre acreditou em mim, me apoiou, me ajudou e soube ser compreensível em todos os momentos.

A minha família, que sempre me incentivou a estudar, e sempre viu nos estudos melhores oportunidades para mim, do que as que tiveram.

A Diana Morales, que mesmo não estando mais presente, foi umas das pessoas que mais contribuiu com a minha formação. Sempre pronta a ajudar e sempre muito dedicada. Onde quer que esteja, sou muito grata a ti, Diana.

Ao meu amigo David Gonzalez, que me ensinou a manter a calma sempre e fazer as coisas com tranquilidade.

Ao Gustavo Klabunde, por todo auxílio nas análises moleculares, foi sempre muito gentil e atencioso.

A Daniela Werner, que me ajudou muito na tentativa de micropropagação da *Mimosa catharinenses*. Apesar de não ter dado bons resultados, me ensinou muitas coisas que poderão ser empregadas em um trabalho futuro.

A todos os meus colegas e amigos do mestrado, que trilharam comigo esse caminho. Tenho certeza de que guardarei e levarei comigo ótimas recordações dessa jornada.

A todos os meus demais amigos, que sempre estiveram presentes na minha vida, tanto nos momentos bons, como nos ruins.

As boas energias do universo.

A CAPES, pela bolsa e pelo apoio financeiro, sem os quais esse trabalho não seria possível.

A FAPESC, pelo apoio financeiro, que deu início ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de ter cursado um mestrado em um programa de excelência, assim como a todo o corpo docente, pela dedicação e seriedade com a qualidade do programa.

Ao meu co-orientador Rafael D. de Armas, que vem me auxiliando desde o meu TCC. Grata!

E por últimos, mas não menos importante, a Universidade Federal de Santa Catarina, que me abrigou pelos últimos sete anos. Que permitiu expandir meus horizontes e tornar as minhas conquistas possíveis.

“Wyrð bið ful aræd”
O destino é inexorável.
Bernard Cornwell

RESUMO

As restingas são importantes ecossistemas costeiros, com ampla distribuição pelo Brasil, mas que se encontram bastante ameaçadas por ações antrópicas. O Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), situado em Florianópolis, SC, apesar de ser uma área de preservação ambiental, também possui áreas de restinga que apresentam caráter degradado devido a introdução de espécies alóctones, principalmente de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. Uma alternativa economicamente viável para a recuperação dessas áreas é a revegetação por meio da inserção de espécies de leguminosas nativas. Estas, por intermédio da associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, necessária pela baixa fertilidade dos solos de restinga, apresentam crescimento rápido, melhoram a qualidade do solo e o protegem contra erosão. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de rizóbios autóctones isolados de áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho em espécies de leguminosas nativas com potencial de emprego em programas de revegetação de áreas degradadas do parque. Para tanto, foram feitos ensaios em casa de vegetação com as espécies de *Mimosa bimucronata*, *Sophora tomentosa* e *Dalbergia ecastophyllum*, nas quais foram avaliados doze isolados de rizóbios autóctones, previamente isolados das áreas de restinga do PAERV, além de tratamentos controle não inoculados contendo baixo e alto fornecimento de nitrogênio. As sementes foram semeadas em tubetes contendo solo esterilizado das áreas de restinga do PAERV. Após cento e vinte dias (*M. bimucronata* e *S. tomentosa*) e noventa dias (*D. ecastophyllum*) de crescimento das plantas, foram avaliados: altura das plantas, compatibilidade simbiótica (presença de nódulos nas raízes), número de nódulos, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca de nódulos, efeitos da inoculação na absorção de nitrogênio nas plantas inoculadas com os rizóbios e eficiência simbiótica. Os rizóbios que apresentaram elevada eficiência simbiótica foram identificados por meio de sequenciamento parcial do gene RNAr 16S. Houve compatibilidade simbiótica para *S. tomentosa* e *M. bimucronata* com todos os doze tratamentos inoculados. Para *D. ecastophyllum*, apenas sete dos tratamentos inoculados forma compatíveis, mostrando que há uma especificidade maior nessa espécie em relação aos simbioss. Em *S. tomentosa*, um isolado apresentou elevada eficiência simbiótica, o R155, e para *M. bimucronata* os isolados R141 e R158. Por meio do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S, foram identificados como *Bradyrhizobium* spp, *Bulkholderia* spp. e *Paenibacillus* spp., respectivamente. É a primeira identificação de

nodulação em *S. tomentosa* pelo gênero *Bradyrhizobium* spp, e do gênero *Paenibacillus* nodulando *M. bimucronata*. Para *D. ecastophyllum*, os isolados que mais influenciaram no acúmulo de biomassa foram o R129, R141, R149 e R155. Alguns dos isolados de rizóbios autóctones mostraram-se com boa capacidade de emprego nas leguminosas nativas avaliadas na revegetação dos solos de restinga contaminados por *Pinus* spp. no PAERV.

Palavras chave: revegetação; bactérias fixadoras de nitrogênio; *Dalbergia ecastophyllum*; *Mimosa bimucronata*; *Sophora tomentosa*.

ABSTRACT

The restingas are an important coastal ecosystem with a wide distribution along Brazil but they are quite threatened for anthropogenic actions. The Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), located in Florianópolis, SC, despite being an environmental preservation area, also have degraded restinga areas due to the introduction of allochthonous species, mainly *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. An economically viable alternative to restore these areas is the revegetation by introduction of native legumes species. These species, by means of symbiotic association with nitrogen-fixing bacteria that are necessary due to the low soil fertility in the restinga, present fast growth, improve the soil quality and protect it against erosion. The objective of this work was to evaluate the efficiency of isolated autochthonous rhizobia from areas of restingas from the Parque Estadual do Rio Vermelho in native legumes species with the potential of application in a program for revegetation of degraded areas from the park. Therefore, tests were made in greenhouse with the species *Mimosa bimucronata*, *Sophora tomentosa* and *Dalbergia ecastophyllum*, in which twelve isolated autochthonous rhizobia were evaluated, previously isolated from restinga areas of PAERV, as well control treatments not inoculated with low and high nitrogen provision. After a hundred and twenty days (*M. bimucronata* and *S. tomentosa*) and ninety days (*D. ecastophyllum*), were evaluated the height of the plants, symbiotic compatibility (presence of nodules on the roots), number of nodules, shoot dry matter, dry matter of roots, dry matter of nodules, the effects of inoculation in nitrogen absorption from inoculated plants with rhizobia and the evaluation of symbiotic efficiency. The rhizobium that presented high symbiotic efficiency were identified by partial sequencing of gene 16S rRNA. There were symbiotic compatibility of *S. tomentosa* and *M. bimucronata* with all twelve inoculated treatments. For *D. ecastophyllum*, only seven inoculated treatments were compatible, showing that there is a higher specificity in this species in relation to symbionts. In *S. tomentosa*, one isolated presented high symbiotic efficiency, the R155, and for the *M. bimucronata* the isolates R141 and R158. By partial sequencing of the 16S rRNA gene, they were identified as *Bradyrhizobium* spp, *Bulkholderia* spp. and *Paenibacillus* spp., respectively. It is the first identification of nodulation in *S. tomentosa* by the genus *Bradyrhizobium* spp, and the genus *Paenibacillus* nodulating *M. bimucronata*. For *D. ecastophyllum*, the isolates which most influenced on the accumulation of biomass were the R129, R141, R149 and R155. Some of the isolated autochthonous rhizobia presented good

usage capacity on the evaluated native legumes from the revegetation restinga soils contaminated by *Pinus* spp. in PAERV.

Key-words: revegetation; nitrogen fixing bacteria; *Dalbergia ecastophyllum*; *Mimosa bimucronata*; *Sophora tomentosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização e zoneamento do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.....	30
Figura 2. Parque Estadual do Rio Vermelho – (A) Restinga seca (RS) dominada pela vegetação de Pinus; (B) densa camada de acículas de Pinus na restinga seca (Fonte: o autor).....	32
Figura 3. Ciclo do nitrogênio em um ecossistema terrestre (Fonte: RAVEN et al., 2007).	40
Figura 4. Estágios no desenvolvimento de um nódulo radicular.....	42
Figura 5. Pontos de coleta das amostras de solo nas áreas de restinga do PAERV, Florianópolis, SC. RM – restinga marinha; RI – restinga sujeita a inundação; RS – restinga seca.	50
Figura 6. Sementes das leguminosas utilizadas no presente trabalho. .	52
Figura 7. Indivíduos das espécies empregadas nesse trabalho em tubetes em casa de vegetação com a camada de areia esterilizada, clorofórmio e parafina e a ponteira de 1,5 mL para evitar contaminações na aplicação das soluções nutritivas.....	54
Figura 8. Número (A, B e C) e Massa seca de nódulos (D, E e F) produzidos em <i>S. tomentosa</i> , <i>M. bimucronata</i> e <i>D. ecastophyllum</i> respectivamente, nos tratamentos inoculados que foram compatíveis com cada uma das espécies, após 120 dias (<i>S. tomentosa</i> e <i>M. bimucronata</i>) e 90 dias (<i>D. ecastophyllum</i>) de crescimento.....	60
Figura 9. Crescimento da parte aérea de <i>S. tomentosa</i> (A), <i>M. bimucronata</i> (B) e (C) <i>D. ecastophyllum</i> , tratamentos inoculados e controles com C/N e B/N após 120 dias (<i>S. tomentosa</i> e <i>M. bimucronata</i>) e 90 dias (<i>D. ecastophyllum</i>) de crescimento.	62
Figura 10. <i>S. tomentosa</i> - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com B/N e C/N.....	63
Figura 11. <i>M. bimucronata</i> - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com B/N e C/N.....	64
Figura 12. <i>D. ecastophyllum</i> - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com baixo teor de nitrogênio (B/N) e com alto teor de nitrogênio (C/N).	65
Figura 13. Massa seca da parte aérea (A) <i>S. tomentosa</i> (B) <i>M. bimucronata</i> e (C) <i>D. ecastophyllum</i> , e Massa seca da raiz (D) <i>S. tomentosa</i> , (E) <i>M. bimucronata</i> e (F) <i>D. ecastophyllum</i> , inoculadas com isolados rizóbios e os controles C/N e B/N, após 120 dias (<i>S. tomentosa</i> e <i>M. bimucronata</i>) e 90 dias (<i>D. ecastophyllum</i>) de crescimento..	67

Figura 14. Teor de nitrogênio em *S. tomentosa* (A), *M. bimucronata* (B) e *D. ecastophyllum* (C), e Acúmulo de nitrogênio em *S. tomentosa* (D), *M. bimucronata* (E) e *D. ecastophyllum* (F), inoculadas com rizóbios e controles C/N e B/N, após 120 dias (*S. tomentosa* e *M. bimucronata*) e 90 dias (*D. ecastophyllum*) de crescimento.....70

Figura 15. Eficiência simbiótica de rizóbios para *S. tomentosa* (A), *M. bimucronata* (B) e *D. ecastophyllum* (C).....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos físico-químicos de amostras de solo coletadas na Restinga Seca (RS) do PAERV, Florianópolis, SC.....	53
Tabela 2. Coeficiente de Correlação de Pearson entre os atributos relacionados a nodulação e crescimento em <i>S. tomentosa</i> , <i>M. bimucronata</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	68
Tabela 3. Identificação das estirpes isoladas em solos de restinga do PAERV, Florianópolis, SC, mais eficientes simbioticamente em <i>S. tomentosa</i> (R155), <i>M. bimucronata</i> (R141 e R158) e <i>D. ecastophyllum</i> (R129, R141, R149 e R155).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	Acúmulo de Nitrogênio
APP	Área de Preservação Permanente
BFN	Bactérias Fixadoras de Nitrogênio
B/N	Baixa Concentração de Nitrogênio
BNL	Bactérias que Nodulam Leguminosas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
C/N	Alta Concentração de Nitrogênio
ddNTP	Didesoxinucleotídeos
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ES	Eficiência Simbiótica
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
LFDGV	Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
LMPB	Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos
PAERV	Parque Estadual do Rio Vermelho
N	Nitrogênio
NN	Número de Nódulos
NPB	Número de Pares de Bases
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MSPA	Massa Seca da Parte Aérea
MSN	Massa Seca de Nódulos
MSR	Massa Seca das Raízes
NGS	Next Generation Sequencing
RI	Restinga Sujeita a Inundação
RM	Restinga Sob Influência Marinha
RS	Restinga Seca
SNUC	Sistema Nacional de Unidades de Conservação
TAE	Tampão Tris-Acetato EDTA
TN	Teor de Nitrogênio
UC	Unidade de Conservação
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

YM

Yeast Malt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Restinga: caracterização, importância e distribuição no Brasil	27
2.2 Parque Estadual do Rio Vermelho	29
2.3 Utilização de leguminosas em programas de revegetação	33
2.3.1 <i>Mimosa bimucronata</i>	35
2.3.2 <i>Sophora tomentosa</i>	37
2.3.3 <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	39
2.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio	40
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4. HIPÓTESE	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Rizóbios selecionados	49
5.2 Leguminosas arbóreas	50
5.3 Meios de cultura e soluções nutritivas	50
5.4 Compatibilidade, eficiência simbiótica dos rizóbios e promoção do crescimento vegetal	51
5.5 Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rRNA 16S	55
5.5.1 Extração de DNA.....	55
5.5.2 Amplificação das amostras.....	56
5.6 Análises estatísticas	57
6. RESULTADOS	59

6.1 Nodulação em leguminosas inoculadas com rizóbios autóctones de restinga	59
6.2 Efeitos da inoculação sobre o crescimento das leguminosas nativas inoculadas com rizóbios autóctones	61
6.3 Efeitos da inoculação de rizóbios autóctones sobre o teor e acúmulo de nitrogênio em leguminosas nativas.....	69
6.4 Eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios autóctones em leguminosas.....	71
6. 5 Sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados mais eficientes simbioticamente	73
7. DISCUSSÃO	75
7.1 Nodulação em leguminosas inoculadas com rizóbios autóctones de restinga	75
7.2 Efeitos da inoculação de rizóbios autóctones sobre o crescimento, teor e acúmulo de nitrogênio pelas leguminosas nativas.....	78
7.3 Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios do PAERV	79
7.4 Sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados mais eficientes simbioticamente	81
8. CONCLUSÕES.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

Na costa brasileira, há ocorrência de planícies formadas por sedimentos terciários e quaternários que foram predominantemente depositados em ambientes marinhos, continentais ou transicionais que são denominados de restinga (SILVA, 1999). De uma forma geral, a restinga é caracterizada por ser uma planície baixa, com suaves ondulações e declives em direção ao mar. Além disso, o termo restinga possui um significado geomorfológico, dando conotação a qualquer depósito arenoso ao longo da costa (SUGUIO e MARTIN 1987; FERNANDES, 1998).

Segundo a Resolução CONAMA Nº 261, de 30 de junho de 1999 (Brasil, 1999), as restingas são complexos vegetacionais edáficos e pioneiros, com florística e fisionomia distintas encontradas em terrenos arenosos de origem marinha como praias, cordões arenosos, dunas e depressões associadas a planícies e terraços, compreendendo formações originalmente herbáceas, subarbusculares, arbustivas ou arbóreas, que podem ocorrer em mosaicos em função de gradientes locais.

Os solos de restinga são caracterizados como solos de textura arenosa e geralmente pobres em matéria orgânica, com baixa capacidade de retenção de água e baixa fertilidade, no entanto, são essenciais para a manutenção dos componentes biológicos do sistema (HAY e LACERDA, 1984; ARAÚJO, 1997).

A vegetação em solos de restinga é adaptada, e apresenta muitas vezes características xeromórficas, ou seja, adaptam-se bem a ambiente secos e quentes. O solo não constitui a principal fonte de nutrientes para as plantas na restinga, devido à proximidade do mar essa fonte é o spray marinho presente na atmosfera (LEÃO e DOMINGUEZ, 2000).

Apesar de sua importância, as restingas são ecossistemas altamente ameaçados devido a degradação decorrente da privatização de áreas públicas, implantação de loteamentos e condomínios, introdução de espécies alóctones, além de grandes projetos turísticos (RADAMBRASIL, 1983; HOLANDA, 1988; ASSIS et al., 2004; ARAÚJO e HENRIQUES, 2007).

Considerando essa situação, torna-se evidente a necessidade de preservação e recuperação das áreas de restinga, sendo a criação de Unidades de Conservação (UCs) uma estratégia extremamente eficaz na manutenção dos recursos naturais (MMA, 2015), além do que, a Convenção Sobre Diversidade Biológica (CDB) preconiza a conservação *in situ* (MMA, 2011). As UCs se encontram divididas em duas categorias

principais: Unidades de Proteção Integral e Unidades de Uso Sustentável.

Dentre as Unidades de Proteção Integral, cabe destacar aqui os parques, que são áreas destinadas à preservação dos ecossistemas naturais e sítios de beleza cênica. O parque dentre as categorias de proteção integral, é a que possibilita uma maior interação entre o visitante e a natureza, pois permite o desenvolvimento de atividades recreativas, educativas e de interpretação ambiental, além de permitir a realização de pesquisas científicas (MMA, 2015).

O Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), situado em Florianópolis, SC, é uma Unidade de Proteção Integral, que foi criada em 2007 com uma área de 1532 hectares (FERREIRA et al., 2009). O objetivo da criação do Parque foi conservar amostras da Floresta Ombrófila Densa, conservar a vegetação de restinga, conservar a fauna associada ao domínio da Mata Atlântica, manter o equilíbrio do complexo hídrico da região, além de propiciar ações de recuperação dos ecossistemas alterados e propiciar a realização de pesquisas científicas e a visitação pública (FATMA, 2015).

Apesar do PAERV ser uma área de proteção ambiental integral, o mesmo apresenta-se bastante degradado, principalmente pela introdução, na década de 60, de espécies alóctones de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. em substituição a vegetação nativa, tornando as áreas de restinga vítimas de degradação. A introdução de espécies alóctones leva a um processo de contaminação biológica, sendo as mesmas muitas vezes dominantes no ambiente, acarretando mudanças na fisionomia e na função dos ecossistemas naturais, levando as populações nativas à perda de espaço e ao declínio genético (BECHARA, 2003). Isso faz com que as espécies nativas tenham dificuldades de se estabelecerem naturalmente, sendo necessárias medidas que permitam o crescimento dessas plantas.

Dentre essas medidas, a revegetação de áreas impactadas com espécies de leguminosas autóctones é uma estratégia de recuperação de baixo custo de implantação e manutenção. Para tanto, devem ser selecionadas plantas que apresentem crescimento rápido, além da capacidade de realizarem simbiose mutualística com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), conhecidas popularmente como rizóbios, condição essencial para o estabelecimento dessas espécies vegetais, frente as condições de baixa fertilidade dos solos de restinga.

Desta forma, há grande potencial de emprego da simbiose na produção de mudas de leguminosas autóctones, favorecendo a formação de uma cobertura vegetal nos solos de restinga, visando o controle dos processos erosivos e a recuperação das propriedades do solo, bem como

proporcionando condições físicas, químicas e biológicas para o aumento da atividade biológica nessas áreas, o que é de extrema importância para o restabelecimento da biocenose dos ambientes impactados (SIQUEIRA et al., 2008).

Visando a recuperação ambiental das áreas de restinga do PAERV, podemos destacar as espécies leguminosas autóctones *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze (Maricá), *Sophora tomentosa* L. (Feijão-da-praia) e *Dalbergia ecastophyllum* (Marmeleiro-do-mangue) como plantas que apresentam grande potencial para uso em programas de revegetação do PAERV. No entanto, são escassos ou inexistentes os trabalhos com essas espécies vegetais que tratem da seleção de rizóbios eficientes para essas leguminosas, que avaliem o potencial dessas espécies em programas de revegetação, bem como estudos que avaliem a eficiência de rizóbios autóctones de áreas de restinga capazes de nodular essas leguminosas.

Em um trabalho realizado anteriormente por Canei (2014), foram isolados 97 rizóbios de áreas de restinga do PAERV, no entanto, faz-se necessário estudos que avaliem a eficiência simbiótica desses rizóbios nas espécies vegetais de *M. bimucronata*, *D. ecastophyllum* e *S. tomentosa*, afim de selecionar os rizóbios mais eficientes na promoção do crescimento dessas espécies vegetais para posteriores ensaios de revegetação visando a recuperação dessas áreas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Restinga: caracterização, importância e distribuição no Brasil

Ao longo da costa litorânea brasileira ocorrem planícies formadas por sedimentos terciários e quaternários depositados, predominantemente, em ambientes marinho, continental ou transicional. Essas planícies estão comumente associadas às desembocaduras de grandes rios e/ou reentrâncias na linha de costa, e podem estar intercaladas por falésias e costões rochosos de idade pré-cambriana, sobre os quais assentam-se eventualmente sequências sedimentares e vulcânicas acumuladas em bacias paleozóicas, mesozóicas e cenozóicas (VILLWOCK, 1994; SILVA, 1999).

As restingas são também comumente denominadas na literatura como “planícies costeiras” ou “planícies litorâneas”, e possuem significados distintos associados a estas fisionomias (SUGUIO e TESSLER, 1984; SUGUIO e MARTIN, 1990; WAECHTER, 1990; SOUZA et al., 2007), que podem estar restritos ao tipo de vegetação que recobre estas planícies, ou como o sistema substrato-vegetação como um todo.

De acordo com a Resolução do CONAMA nº 261/1999 (BRASIL, 1999), restinga é um ecossistema que compreende comunidades vegetacionais e florísticas fisionomicamente distintas, situadas em terrenos predominantemente arenosos, de origens marinha, fluvial, lagunar, eólica ou combinações destas. É caracterizada como um conjunto de ecossistemas variados fito fisionomicamente, com diferenças geomorfológicas, pedológicas e climáticas, além de possuir diferentes etapas sucessionais (MMA, 2015).

A gênese do substrato sobre o qual desenvolvem-se os diferentes tipos vegetacionais depende de um conjunto variado de fatores, dentre os quais destacam-se as variações relativas do nível do mar, decorrentes de mudanças paleoambientais ocorridas durante o Quaternário, associadas às correntes de deriva litorânea, às “armadilhas” para retenção dos sedimentos e às fontes primárias de sedimentos (SUGUIO e TESSLER, 1984; SUGUIO e MARTIN, 1987).

Em relação aos tipos de vegetação existentes nas restingas brasileiras, são caracterizadas seis formações vegetais diferentes: formação halófila, psamófila reptante, pós-praia, arbustiva aberta, arbustiva fechada e mata de restinga (OLIVEIRA e MAIA, 2005).

Nas linhas de praia das restingas há o estabelecimento de uma vegetação que se encontra adaptada às condições salinas e arenosas sob a influência das marés, denominada halófila-psamófila, com espécies herbáceas reptantes que apresentam sistemas radiculares muito amplos (ANDRADE, 1966; BARROS et al., 1991; ALMEIDA e ARAÚJO, 1997).

Sobre cordões mais estáveis, encontra-se uma vegetação arbustiva e arbórea mais densa com muitas bromélias terrícolas. A camada orgânica desse solo é pouco desenvolvida, sendo as bromélias as grandes estabilizadoras desse sistema e retentoras de água e nutrientes (RODRIGUES et al., 2009)

O tamanho da vegetação na restinga aumenta à medida que se afasta da praia, formando barreiras de difícil penetração, cuja aparência das copas se encontram alteradas pelas direções predominantes dos ventos (NEVES FILHO, 2009). A restinga arbustiva arbórea apresenta características adaptativas as condições tão diversas comparadas com aquelas encontradas na Mata Atlântica de onde se originam.

O litoral catarinense possui uma extensão de aproximadamente 460 km, tendo como limites o rio Saí-Guaçu ao norte, no município de Itapoá, fazendo divisa com o estado do Paraná, passando pela ilha de São Francisco do Sul, a ilha de Florianópolis e se estendendo até o município de Passo de Torres, na divisa com o estado do Rio Grande do Sul, abrangendo também diversas ilhas de menor tamanho (REITZ, 1961). Nesta região litorânea encontra-se a restinga, podendo ocorrer numa faixa que varia de poucos metros a 7 km para o interior do continente (REITZ, 1961; IBGE, 1992).

Segundo Falkenberg (1999), as restingas catarinenses podem apresentar fisionomias herbácea/subarbustiva, arbustiva ou arbórea que podem se propagar nos habitats de praia, dunas frontais, dunas internas, baixadas secas e úmidas.

A vegetação de restinga tem um papel fundamental na fixação do substrato arenoso que se encontra sujeito à ação erosiva dos ventos. Com a cobertura vegetal a probabilidade de problemas de bloqueio de estradas e invasão em habitações é reduzida, além de atenuar o assoreamento de brejos, lagoas e canais (ARAÚJO e LACERDA, 1987; ASSUMPÇÃO e NASCIMENTO, 2000).

Apesar de este bioma ser considerado como Área de Preservação Permanente (APP) pelo Código Florestal, Lei Federal nº 12.727/2012 e pela Resolução nº 303 de 20 de março de 2002 do Conselho Nacional do Meio ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2002), a vegetação de restinga

vem sofrendo forte pressão antrópica. Devido aos conflitos acerca do conceito de restinga como já foi visto, sobre diferentes definições geomorfológica e ecológica, ocorrem problemas na aplicação da legislação ambiental vigente para áreas costeiras, ocasionando a fragilidade da preservação deste ecossistema (SOUZA, 2008).

Sugiyama (1998) revela que alguns trechos preservados de florestas de restinga são encontrados dentro de UCs, sendo a proteção destas áreas de suma importância, não só para a manutenção da biodiversidade, mas também como fonte de espécies para recuperação de áreas de planícies arenosas costeiras e também de áreas de Mata Atlântica, já que 50 % das espécies desta flora ocorrem também nesta formação vizinha. A restinga, além de ser habitat para diversas espécies, é área de reprodução e alimentação de inúmeras espécies de aves migratórias, répteis e peixes. Sem falar que muitas espécies vegetais são restritas a esse ecossistema devido as suas muitas características únicas, sendo fundamentais também, para a retenção de sedimentos (IBGE, 2004; RODRIGUES, 2008).

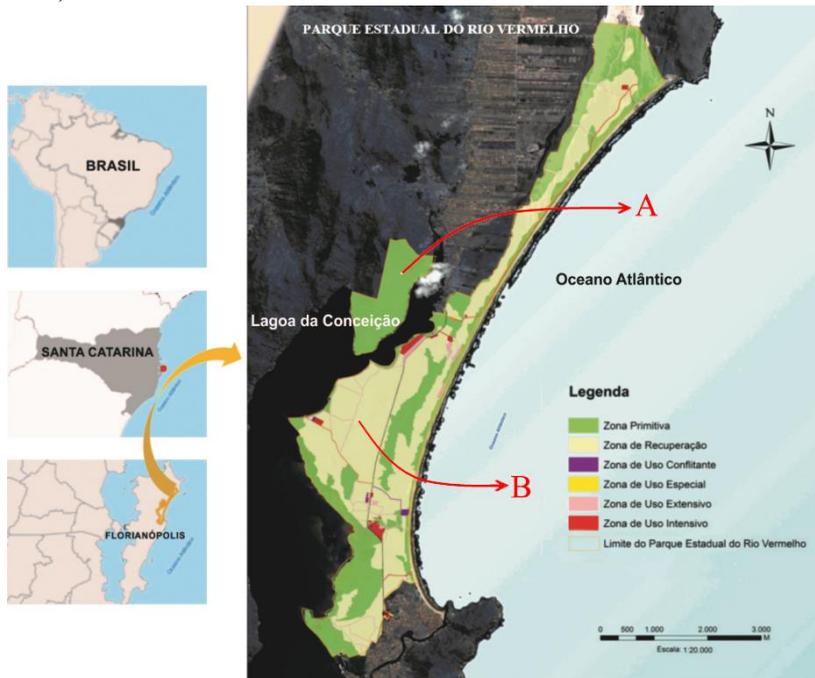
2.2 Parque Estadual do Rio Vermelho

O Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV) é uma Unidade de Proteção Integral, criada em 2007, com 1.532 hectares, sendo um dos poucos fragmentos com área maior que 100 hectares, fazendo parte dos 27 % de Mata Atlântica considerada bem preservada. O PAERV (Figura 1) se situa no nordeste da ilha, entre o Oceano Atlântico e a Lagoa da Conceição (FERREIRA et al., 2009).

Estudos no PAERV mostraram que existem cerca de 170 espécies vegetais nativas e há em especial uma espécie, *Mimosa catharinensis* Burkart, descoberta em 1964, que se encontra presente somente no PAERV e em Governador Celso Ramos - SC (MORAES et al., 2004; MEDEIROS, 2014), sendo portanto, uma espécie endêmica restrita.

A fauna do parque está representada por cerca de 72 espécies de aves, 15 espécies de répteis e 25 espécies de mamíferos (FERREIRA et al., 2009). No entanto, estudos com microrganismos de importância destacada para o equilíbrio dos ecossistemas, como é o caso dos rizóbios e das micorrizas, não foram realizados no PAERV.

Figura 1. Localização e zoneamento do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. A) área do Morro dos Macacos inserida na Serra Litorânea, com predomínio da floresta ombrófila densa; B) planície costeira, com predomínio de vegetação de restinga (Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., 2009).



Cabe destacar a presença no PAERV de *Scaevola plumieri* (L) Vahl espécie ameaçada de extinção; a endêmica *Mimosa catharinensis* Burkart (MORAES et al., 2004); e uma espécie muito rara, *Aristolochia robertii* Ahumada, que só ocorre no PAERV e em Torres, RS (REITZ, 1975). Isso aumenta ainda mais a necessidade de preservação e recuperação do PAERV, a partir da substituição de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. por espécies nativas, visando a recuperação das condições paisagísticas originais do parque e, consequentemente, a manutenção da biodiversidade associada a essas espécies vegetais.

Nos anos, 60 a área que hoje ocupa o PAERV, havia sido transformada em uma Estação Florestal, em resposta a Lei de Incentivos Fiscais do Governo Federal nº 5.106 de 1966, a qual oferecia descontos no imposto de renda para quem tomasse iniciativas de reflorestamento

(BECHARA, 2003). A estação foi criada em 1962 pelo governo do estado de Santa Catarina e tinha por objetivo principal a experimentação de plantas alóctones, selecionando-se espécies mais aptas a crescer e “proteger” a orla marítima do Estado (BERENHAUSER, 1973).

Dessa forma, foram selecionadas 25 espécies de *Pinus* spp., duas de *Eucalyptus* spp. (*Eucalyptus robusta* e *E. saligna*), entre outras espécies alóctones, como *Casuarina equisetifolia* L., *Acacia podalyriifolia* e *A. longifolia*, as quais foram introduzidas substituindo a vegetação original das áreas de restinga (BERENHAUSER, 1973). Dentre as espécies introduzidas destacaram-se em seu estabelecimento *P. elliotii* e *P. taeda*, sendo utilizada uma área de 487 ha para o plantio dessas espécies. Para *E. robusta* e *E. saligna* a área foi de 3 ha (CARUSO, 1983). Estima-se que em virtude do plantio de *Pinus* spp. a mais de 40 anos nessas áreas, 250 hectares de dunas e restingas adjacentes ao plantio já foram invadidas por ele, sendo que atualmente 750 ha são cobertos por *Pinus* spp. no PAERV (BECHARA et al., 2013).

Em decorrência da introdução das espécies alóctones, os sistemas costeiros tornaram-se susceptíveis à degradação, pois essas espécies inibiram o desenvolvimento e a sobrevivência da fauna e flora nativas (HORN FILHO, 2006). Essa prática de introdução de plantas alóctones é considerada a segunda maior causa de extinções de espécies no mundo (BRASIL2, 2002), ficando atrás apenas da fragmentação e perda de habitats (D'EON et al., 2002).

As espécies do gênero *Pinus* spp. causam alterações nas propriedades físicas e químicas das diferentes classes de solos. Isto se deve ao fato de que os nutrientes ficam retidos em quantidades consideráveis nos resíduos não decompostos das plantas, alterando o equilíbrio do sistema solo-planta (CHAVES e CORRÊA, 2005).

A ocupação por espécies do gênero *Pinus* em uma determinada área durante um longo período de tempo, leva a formação de uma densa camada acículas (Figura 2). As acículas do *Pinus* são de difícil degradação (STURGUSS, 1991), além de possuírem ceras cuticulares que reduzem o efeito da ação mecânica. Foi também comprovado por Kin e Shin (2005) o efeito antibacteriano de compostos voláteis da espécie *P. densiflora*.

Figura 2. Parque Estadual do Rio Vermelho – (A) Restinga seca (RS) dominada pela vegetação de *Pinus*; (B) densa camada de acículas de *Pinus* na restinga seca (Fonte: o autor).



A presença do *Pinus* spp. na restinga do PAERV provoca mudanças na influência dos ventos sobre a vegetação nativa, uma vez que a estrutura e o porte da vegetação estão relacionados aos regimes do vento e das condições edáficas impostas nessas áreas. Esses fatores influenciam no hábito das plantas, provocando uma estratificação, como é observado na vegetação de restinga. O vento possui outro papel importante, na dispersão de sementes, sendo assim, os plantios de *Pinus* spp. agem como uma barreira para a dispersão de sementes nativas, isolando ainda mais os fragmentos de restinga (MMA, 2009).

A Estação Florestal do Rio Vermelho, foi transformada em Parque Florestal do Rio Vermelho em 1974, pelo Decreto Estadual nº 994, tendo como objetivos controversos: “restaurar a flora e fauna”, “introduzir essências florestais nativas ou exóticas”, e “desenvolver técnicas de drenagem para aproveitamento de áreas alagadiças, assim como técnicas para a fixação e reflorestamento de dunas” (CECCA, 1997). Entretanto, como o nome do Parque não se encaixava em nenhuma categoria do SNUC (Sistema Nacional de Unidades de Conservação), em 24 de maio de 2007, pelo Decreto nº 308, foi criado então o PAERV (VITALI e UHLIG, 2010).

Sendo assim, o PAERV passou a ser uma Unidade de Proteção Integral, passando a ter como objetivo conservar amostras de floresta ombrófila densa, conservar a vegetação de restinga, conservar a fauna associada ao domínio da Mata Atlântica, manter o equilíbrio do complexo hídrico da região, propiciar ações de recuperação dos ecossistemas alterados e proporcionar a realização de pesquisas científicas e a visitação pública (FATMA, 2015).

Mesmo que o PAERV se encontre com seu ecossistema descaracterizado devido às espécies alóctones introduzidas, ainda

apresenta cerca de 400 ha de floresta ombrófila densa e 250 ha de restinga preservadas que representam importantes fontes genéticas que podem ser utilizadas na recuperação das demais áreas do PAERV (FALKENBERG, 1999; NETO, 2009), embora sejam áreas fragmentadas (BECHARA, 2003), apresentando um maior risco a esse ecossistema (RICKLEFS, 2010). Faz-se necessário com extrema urgência a elaboração de um plano de manejo que vise a retirada das espécies alóctones do parque, bem como, estratégias de recuperação do solo.

2.3 Utilização de leguminosas em programas de revegetação

A recuperação de áreas degradadas por métodos físico-químicos convencionais normalmente exige um grande investimento financeiro, apresentam eficácia limitada, e podem até mesmo afetar de forma irreversível as propriedades do solo (FRANCO et al., 1992; DELGADILLO et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que um meio econômico e viável para a recuperação dessas áreas é a revegetação com espécies leguminosas que, quando inoculadas com os microssimbiontes rizóbios e/ou fungos micorrízicos, podem crescer e se estabelecer nestes locais (SCHIAVO, 2005; NASCIMENTO e BIONDI, 2008; SIQUEIRA et al., 2008; LASTE et al., 2008).

A revegetação de áreas degradadas consiste na inserção de uma cobertura vegetal visando a recuperação paisagística, assim como o controle dos processos erosivos e a recuperação das propriedades do solo (SIQUEIRA et al., 2008), além de trazer outros benefícios tais como: proteção contra a radiação solar, que mantém as temperaturas mais baixas e reduz a perda de água por evaporação, maior ciclagem de nutrientes, além de beneficiar as atividades biológicas no solo (GASSEN e GASSEN, 1996).

É importante que as espécies de plantas selecionadas para revegetação se adaptem bem às condições prevalentes de solo e ambiente, sendo ainda ideal que essas espécies formem associação com BFN, garantindo capacidade de fixação do N₂ atmosférico em virtude da carência desse nutriente na maioria dos solos degradados (SIQUEIRA et al., 2008).

Outro ponto crucial na escolha das espécies de leguminosas a serem utilizadas em programas de revegetação diz respeito às características fisiológicas e morfológicas, como capacidade de fixar nitrogênio em determinado sistema ou até mesmo de produzir compostos

alelopáticos. Foi observado por Stuart (2010) em um trabalho realizado em áreas de restinga com espécies de leguminosas, no qual se buscou entender se haveria facilitação na propagação de outras espécies pelo uso de espécies leguminosas. Algumas espécies de leguminosas atuaram realmente como facilitadoras, como era o esperado, mas outras influenciaram negativamente o estabelecimento de outras espécies.

Nesse contexto, a adoção de programas de revegetação com espécies leguminosas nativas pode desempenhar papel importante no aumento da fertilidade do solo. Essas espécies vegetais são adaptadas às condições de solo do local, devendo ser selecionadas plantas reconhecidas como pioneiras, pois apresentam crescimento rápido e são capazes de melhorar as condições físicas e químicas do solo, acumulando matéria orgânica e reciclando nutrientes (FRANCO, 1991). A deposição de folhas e o crescimento das raízes das espécies pioneiras estabilizam o solo, aumentam a atividade biológica e criam condições favoráveis para o estabelecimento de outras espécies mais exigentes (FRANCO et al., 1992).

A família Leguminosae também conhecida como Fabaceae, é a terceira em número de espécies (cerca de 19.325), após Compositae e Orquidiaceae, e a segunda família economicamente mais importante (JUDD et al., 2009). Distribuem-se em mais de 650 gêneros e podem ser encontradas nos mais variados habitats, do Ártico aos trópicos. A família inclui árvores, arbustos e herbáceas, divididas em três subfamílias, Cesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (BARROSO et al., 1984). A sua capacidade para associar-se com BFN é uma característica muito interessante do ponto de vista da colonização dos solos pobres, da melhoria ou recuperação de solos degradados, além da sua utilização em práticas agrícolas (PASCUAL, 2003).

São conhecidas no Brasil cerca de 2.000 espécies de leguminosas, representando cerca de 10 % do total de espécies de leguminosas do planeta (LEWIS et al., 2005), sendo que desse total apenas 3.856 foram estudadas em relação a capacidade de nodular, e destas, 3.397 apresentaram essa capacidade (FARIA et al., 1999). Espécies nodulíferas são a maioria em Mimosoideae (90 %) e Papilionoideae (96 %).

Uma condição primordial no sucesso da revegetação diz respeito a escolha das espécies leguminosas, sendo determinada de acordo com o tipo de solo (FARIA e CAMPELO, 2000). No entanto, pelo fato de não haverem estudos dessa natureza no PAERV e como preconiza-se a utilização de espécies leguminosas autóctones no processo de revegetação, evitando a introdução de mais espécies alóctones, algumas

características importantes devem ser consideradas para nortear essa seleção de espécies como: apresentarem crescimento rápido; capacidade de se associarem simbioticamente com rizóbios; serem espécies nativas, de preferência endêmicas e plantas que são tolerantes ao estresse local, no caso à presença do *Pinus* spp. Pelas justificativas apresentadas, as espécies escolhidas para esse trabalho foram a *S. tomentosa*, *M. bimucronata* e *D. ecastophyllum*, pois apresentam todas as características desejáveis para esse processo, como pode ser observado na sequência.

2.3.1 *Mimosa bimucronata*

M. bimucronata (DC) Kuntze, é uma espécie nativa no PAERV (MMA, 2009), também conhecida popularmente como maricá, pertencente à família Leguminosae e subfamília Mimosoideae. Ocorre de forma natural no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no extremo noroeste do Uruguai. No Brasil, esta espécie é encontrada nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Desenvolve-se em ambientes de floresta estacional decidual, floresta ombrófila densa, na formação de baixo-montanha, na planície quaternária, nas várzeas e próximo de regatos sujeitos a inundações periódicas ou locais úmidos, restinga e caatinga (LORENZI, 2002). É uma planta perene, arbórea, medindo de 4 a 8 m de altura, altamente ramificada e espinhosa, cuja reprodução é realizada por sementes (LORENZI, 2000).

A espécie possui alta fertilidade e propriedades físicas adequadas para uma espécie pioneira na sucessão florestal (REITZ et al., 1988; MARCHIORI, 1993). Sendo adaptada a solos arenosos encharcados e mal drenados, com pH variando entre 4,0 e 5,0 (EMBRAPA, 1988; SPRENT, 2001; PATREZE e CORDEIRO, 2005). Entretanto, em plantios experimentais, tem obtido melhor crescimento em solos bem drenados, com textura argilosa e areno-argilosa (REITZ et al., 1988; MARCHIORI, 1993).

As plantas de espécies pioneiras apresentam sementes que germinam apenas sob condição de alta temperatura e luminosidade, têm o hábito de crescimento mais rápido do que as não pioneiras, as quais apresentam habilidade de germinar e sobreviver na sombra e na presença de clareiras pequenas, e têm o crescimento otimizado pelo ambiente parcialmente sombreado (KAGEYAMA e CASTRO, 1989).

M. bimucronata é uma excelente espécie pioneira para o processo de recuperação de áreas impactadas pela atividade de mineração e pastejo, além de fornecer abrigo para fauna e proteger as plântulas de diversas espécies do pisoteio de bovinos (BRASIL, 1994 e BITENCOURT et al., 2007). O reflorestamento com essa leguminosa é relativamente fácil, em virtude de sua grande adaptabilidade e crescimento rápido (REITZ et al., 1983), além de reprodução por estaquia (BRAGA, 1960).

No contexto da importância florestal, a espécie *M. bimucronata* pode ser recomendada para a composição de reflorestamento heterogêneos em áreas degradadas ou perturbadas, bem como para o controle de processos erosivos e para o plantio em terrenos sujeitos à inundação periódica, uma vez que apresenta uma boa adaptação a terrenos úmidos e rochosos (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2004).

Outro aspecto relevante para a atuação de *M. bimucronata* no processo de recomposição florística de uma determinada área é tratar-se de uma espécie vegetal capaz de estabelecer relações simbióticas com microrganismos, tais como as BFN (SPRENT, 2001; CANOSA et al., 2012) e fungos micorrízicos (PATREZE e CORDEIRO, 2004).

Em estudo relacionado à resposta da adubação mineral e da inoculação com rizóbios e micorrizas nas espécies *Anadenanthera colubrina*, *M. bimucronata* e *Parapiptadenia rigida*, em condições de viveiro, foi constatado que o estabelecimento da simbiose favoreceu o crescimento das espécies vegetais (PATREZE e CORDEIRO, 2004).

Pesquisas realizadas por Faria (1997) retratam a existência de estirpes (BR 3461 e BR 3460) eficientes na fixação biológica do nitrogênio em *M. bimucronata*. Trabalhos realizados por Faria e Uchôas (2007) também demonstraram por meio de experimentos, mais duas estirpes eficientes em fixar nitrogênio em *M. bimucronata*, BR3505 e BR3506.

Mimosa spp. pode também se associar simbioticamente com os gêneros: *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Ralstonia* (MOREIRA et al., 2008).

Foi observado nas espécies *M. pigra* e *M. scrabella* associação com *Burkholderia mimosarum* (CHEN et al., 2006); em *M. diplotricha* e *M. pudica* associação com *B. caribensis*, *B. cepacia* gen. VI, *B. tuberum* e *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002); em *M. pudica* e *M. diplotricha* simbiose com *Ralstonia taiwanensis* (CHEN et al., 2001); *M. affinis* com *Rhizobium etli* bv. *Mimosae* (WANG et al., 1999); entre *Mesorhizobium loti* e o gênero *Mimosa* (JARVIS et al., 1997); *M. invis*a e *M. pudica* com *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. e

Bradyrhizobium japonicum (OYAIZU et al., 1993); em *M. pigra*, *M. casta* e *M. pudica* com *Burkholderia*, enquanto os demais foram inseridos nos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (BARRETT e PARKER, 2005); em *M. pudica* e *M. pigra* com *Cupriavidus* e *Burkholderia* (BARRETT e PARKER, 2006); em *M. scrabella* com *Burkholderia* e *Rhizobium* (EHRHARDT-BROCARDI et al., 2015); em *M. caesalpiniiifolia*, *M. pudica*, *M. pigra* e *M. acutistipula* com *Cupriavidus* (FERREIRA et al., 2012); em *M. caesalpiniiifolia* e *M. pudica* (FERREIRA et al., 2013); em *M. scrabella* com *Cupriavidus* e *Burkholderia* (PRIMIERY et al., 2016).

Em um estudo com bactérias nodulantes na América do Sul, Chen et al. (2005), isolaram estirpes provenientes de nódulos das espécies *M. acutistipula*, *M. bimucronata*, *M. camporum*, *M. caesalpiniaefolia*, *M. flocculosa*, *M. laticifera*, *M. pigra*, *M. scabrella* e *M. tenuiflora* (Brasil) e *M. pigra* (Venezuela), que foram classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Moura et al. (2016) isolou e testou isolados de rizóbios provenientes de áreas de mineração de carvão em Santa Catarina em maricá, e as estirpes UFSC-B5, UFSC-B12 e UFSC-M8 apresentaram alta eficiência simbiótica comparadas as estirpes recomendadas. Hernández et al. (2017), identificou esses isolados por meio do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S, no qual as estirpes mostraram-se pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Glucanobacter* e *Burkholderia*, respectivamente.

No Brasil a estirpe recomendada pela RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão da tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) e autorizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) para produção de inoculantes para a *M. bimucronata* é a BR 3460, que se refere a espécie *Burkholderia gladioi* (CHEN et al., 2005; MOREIRA et al., 2008).

Entretanto, são necessários novos estudos com outras estirpes, as quais possam contribuir para o ciclo do nitrogênio, garantir a resiliência dos processos biológicos e a manutenção de ecossistemas frágeis, como a restinga.

2.3.2 *Sophora tomentosa*

Sophora tomentosa é uma espécie nativa no PAERV (MMA, 2009), sendo conhecida popularmente como feijão-da-praia. Pertence à família Leguminosae e subfamília Papilionoideae. Ocorre na Mata

Atlântica e na Amazônia, principalmente em restingas e manguezais (LEWIS, 1987; BRITO et al., 2010). É uma espécie arbustiva, que varia de 2 a 5 metros (SILVA e TOZZI, 2011), produz inflorescências amarelas que são visitadas por muitas abelhas (NOGUEIRA e ARRUDA, 2006) sendo estas comuns na restinga e atuam como polinizadores de diversas outras espécies neste ambiente (PANSARIN et al., 2008; PINHEIRO e SAZIMA, 2007), portanto a manutenção destas interações é imprescindível para a conservação deste ecossistema (BRITO et al., 2010).

Em um trabalho realizado por Nogueira (2003) com *S. tomentosa*, mostrou que a espécie tem potencial para utilização em restauração de áreas de restinga degradadas, pois, foi demonstrado em seu trabalho que o período de frutificação e floração é longo, com abundância de flores e frutos, o que atrai várias espécies de visitantes florais e predadores de frutos e sementes. Apresenta polinização cruzada e também autopolinização e agamosporia, que favorece a sua reprodução em ambientes que possuem condições adversas ao voo dos insetos.

S. tomentosa foi utilizada também, na restauração de uma área de restinga degradada do PAERV (BECHARA, 2003), por apresentar características como: alta agressividade, formando grandes touceiras que oferecem boa cobertura do solo; crescimento rápido, atingindo a maturidade no primeiro ano; nitrogenação do solo; flores amarelas altamente vistosas e frutificação longa.

Essa espécie possui a capacidade de se associar simbioticamente com rizóbios (FOSTER et al., 1998; OLIVEIRA, 1999; OLIVEIRA, 2001). A espécie possui capacidade de associar-se simbioticamente com o gênero *Rhizobium* (SUTTON e PETERSON, 1980; FOSTER et al., 1998) e *Sinorhizobium* (HUNG et al., 2005). Chen et al. (1995) e Jarvis et al. (1997) verificaram a nodulação no gênero *Sophora* com a espécie *Mesorhizobium tianshanense*. Tan (2014) também observou nodulação entre espécies do gênero *Mesorhizobium* com *S. microphylla*.

Em um trabalho recente, De Meyer et al. (2016) obtiveram 31 isolados de rizóbios de nódulos de raízes de *Sophora* sp., e a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, os isolados mostraram-se pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*, pertencendo as espécies: *Mesorhizobium sangaii*, *Mesorhizobium cantuariense* e *Mesorhizobium ciceri*, e mais cinco novas espécies: *Mesorhizobium calcícola*, *Mesorhizobium waitakense* sp., *Mesorhizobium sophorae* sp., *Mesorhizobium newzealandense* sp. e *Mesorhizobium kowhii* sp. Segundo Andrews e Andrews (2016), parece haver uma alta

especificidade dos rizóbios que nodulam com a espécie de *Sophora* nativa da Nova Zelândia, uma vez que até o presente momento há relatos de nodulação dessa espécie apenas com *Mesorhizobium*.

2.3.3 *Dalbergia ecastophyllum*

Dalbergia ecastophyllum é uma espécie nativa no PAERV, ocorrendo na América desde a Florida (EUA) até o Brasil. No Brasil, ela é encontrada desde o litoral norte até o município de Palhoça (SC) (CAMARGO, 2005). A espécie é conhecida popularmente como marmelo-do-mangue. É uma espécie observada em formações subarbustivas e arbustivas sobre cordões arenosos de dunas frontais, sendo comum sua ocorrência em restingas (BRASIL, 1999; SOUZA e CAPELLARI Jr., 2004).

A espécie se desenvolve muito bem, sendo capaz de dominar a vegetação, formando um emaranhado de ramos (CARVALHO, 1997; SILVA e BRITZ, 2005), como é possível observar na Praia da Joaquina, Florianópolis, SC (GUIMARÃES, 2006).

D. ecastophyllum possui capacidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio e formar nódulos (OGAN, 1990; SAUR et al., 2000). Parker e Rousteau (2014), observaram associação com o gênero *Bradyrhizobium*, no entanto não testaram a eficiência simbiótica entre eles.

Segundo Andrews e Andrews (2016), a tribo *Dalbergiae* nodulam primeiramente com *Bradyrhizobium*, mas são promiscuas em relação as espécies de *Bradyrhizobium*.

Outras espécies do gênero *Dalbergia* já foram relatadas nodulando com os gêneros da classe α -Protobacteria: *Bradyrhizobium* (FARIA, 1997; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA et al., 1998; PARKER, 2004; RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; COSTA, 2014), *Mesorhizobium*, *Azorhizobium Phyllobacterium* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005), *Rhizobium* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; GHOSH et al., 2005; LIN et al., 2009; COSTA, 2014). E com os gêneros da classe β -Protobacteria: *Burkholderia* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; LU et al., 2012; COSTA, 2014; MOREIRA et al., 2016) e *Ralstonia* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005).

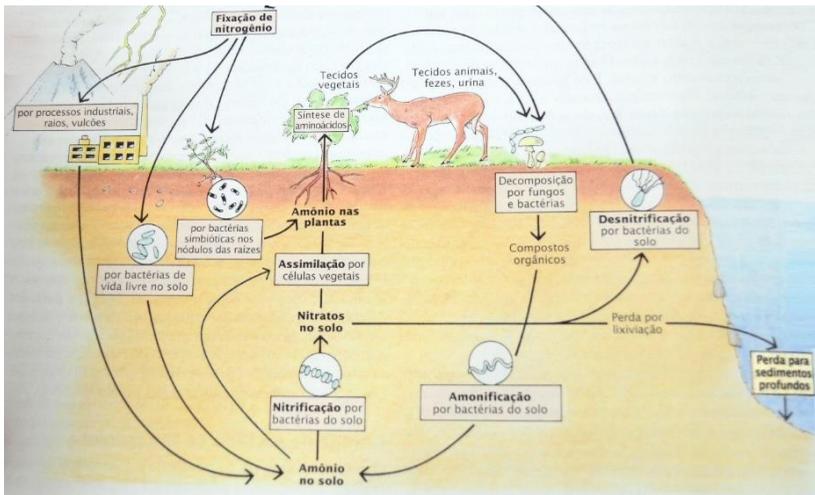
2.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio

Além da seleção das espécies vegetais adequadas para a revegetação no PAERV, cabe destacar que a seleção de BFN é também muito importante, uma vez que as mesmas são fundamentais para que ocorra a fixação biológica do nitrogênio.

O nitrogênio é um elemento fundamental no metabolismo das plantas, uma vez que é utilizado na síntese de proteínas, vitaminas, pigmentos, entre outros compostos orgânicos (MALAVOLTA, 1980; HUNGRIA et al., 2001). Na sua ausência ou baixa disponibilidade, limita o crescimento vegetal, reduzindo a expansão foliar e limitando a fotossíntese (CHAPIN, 1980).

A atmosfera é constituída por mais de 78,08 % de N_2 , mas essa abundância não se encontra disponível diretamente para as plantas, as quais estão obrigadas a utilizar apenas as formas combinadas que se encontram no solo em pequenas quantidades (Figura 3). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribui significativamente com o fornecimento total do nitrogênio necessário para as plantas (MOREIRA et al., 2008).

Figura 3. Ciclo do nitrogênio em um ecossistema terrestre (Fonte: RAVEN et al., 2007).



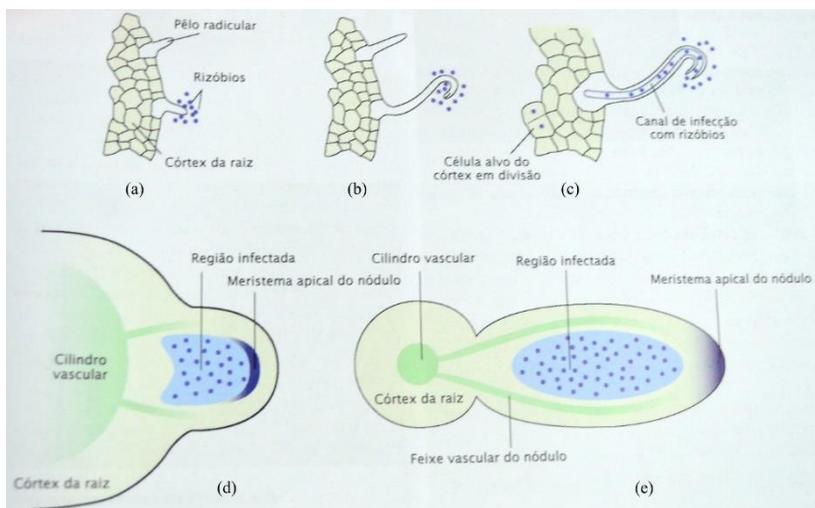
O processo de FBN é restrito a alguns grupos filogenéticos de procariotos, altamente diversos, que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir N_2 a NH_3 . Esses microrganismos podem ser bactérias de vida livre ou em simbiose com plantas e são conhecidos como diazotróficos (VOET e VOET, 1995; MOREIRA et al., 2008).

Os fixadores de vida livre normalmente precisam de uma grande quantidade de glicose para realizar a fixação de uma quantidade pequena de N. Como é o exemplo de um fixador de vida livre o *Azobacter*, que requer o equivalente a 100 unidades de glicose para fixar uma unidade de N. Por outro lado, na fixação simbiótica entre rizóbios e plantas a relação entre o gasto de glicose e a fixação de N se mostra mais eficiente, aonde são necessárias entre 6 a 12 unidades de glicose por unidade de N fixado (PASCUAL, 2003).

Rizóbios são um grupo parafilético onde se concentram as Proteobactérias com capacidade de formar nódulos em simbiose com leguminosas, sendo divididos em α e β -Proteobactérias. Dentro das α -Proteobactérias se encontram os gêneros, *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Rhizobium* (JORDAN, 1982), *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1988), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Blastobacter* (VAN BERKUN e EARDLY, 2002), *Methylobacterium* (JOURAND et al., 2004), *Phyllobacterium* (MANTELIN et al., 2006) e *Ochrobactrum* (TEYSSIER e JUMAS-BILAK, 2010). Nas β -Proteobactérias encontram-se espécies dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001) e *Herbaspirillum* (VALVERDE et al., 2003).

Alguns rizóbios são muito específicos, com capacidade para nodular um número reduzido de espécies, enquanto outros são menos seletivos. A eficiência para infectar as células da raiz se deve ao intercâmbio de sinais entre os simbiontes. Flavonóides exsudatos pelas plantas induzem a expressão dos genes *nod* em *Rhizobium*, envolvidos na síntese dos fatores de nodulação (REDMOND et al., 1986; PERRET et al., 2000). Esses vão estimular os pêlos radiculares permitindo a entrada de rizóbios na planta (Figura 4). Posteriormente, induzem a formação de um canal de infecção, depois a divisão das células corticais, levando à formação dos nódulos que apresentam um interior perfeitamente estruturado (YAO e VINCENT, 1969; XI et al., 2000).

Figura 4. Estágios no desenvolvimento de um nódulo radicular – (a) os rizóbios se ligam a um pêlo radicular emergente, o que os atrai por meio da liberação de sinais químicos; (b) o pêlo radicular se curva em resposta a fatores liberados pelo rizóbio; (c) há a formação de um canal de infecção. Ele conduz os rizóbios em divisão por todo o pêlo até o interior das células corticais, as quais responderão dividindo-se; (d) um nódulo radicular em desenvolvimento a partir da rápida divisão das células corticais infectadas; (e) os feixes vasculares do nódulo estão conectados com os tecidos vasculares do cilindro central da raiz. (Fonte: RAVEN et al., 2007).



Nos nódulos ocorre a redução do nitrogênio gasoso (N_2) em nitrogênio amoniacal (NH_3). Assim, há fixação de nitrogênio sob a forma de amônia, que é disponibilizado à planta simbiote, a qual, em contrapartida, fornece metabólitos para o desenvolvimento dos rizóbios (MUNIZ et al., 2012).

Apesar do grande número de espécies de leguminosas descritas (19.325) não se conhece a capacidade de nodular em cerca de 75 % das espécies de leguminosas do mundo. Somente 55 espécies pertencentes a

12 gêneros de rizóbios foram descritas, uma vez que a pesquisa se encontra direcionada para o interesse agrícola (MOREIRA et al., 2008).

Fatores como o pH (ANDRADE et al., 2002), Ca, Mg, P (FRANCO e DAY, 1980), entre outros micronutrientes e macronutrientes, são essenciais no estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios. Isso salienta ainda mais a importância de utilizar rizóbios das áreas em que há o interesse em fazer a revegetação, uma vez que esses rizóbios já se encontram adaptados às condições físico-químicas do solo onde estão inseridos.

As áreas de restinga do PAERV sofrem grande influência marinha, onde o fator salinidade pode ser limitante no crescimento de BFN, pois o estresse salino pode também reduzir a nodulação por meio de inibição na planta hospedeira, onde sob condições de estresse as plantas produzem grandes níveis de etileno (hormônio gasoso envolvido em diferentes respostas ao estresse) e em várias espécies de plantas o etileno funciona como um regulador negativo da nodulação (JOUYBAN, 2012; PINHEIRO et al., 2014).

Nesse sentido, é estratégico o uso de espécies de leguminosas nativas, e que os isolados de rizóbios indicados para revegetação de áreas degradadas, além de possuírem capacidade de fixar nitrogênio, sejam provenientes das áreas onde se pretende recuperar, pois isso irá permitir um melhor estabelecimento da leguminosa.

Canei (2014) isolou 97 rizóbios de áreas de restinga do PAERV e 9 rizóbios das raízes da *M. catharinensis* no entanto, faz-se necessário estudos que avaliem a eficiência simbiótica desses rizóbios nas espécies vegetais de *D. ecastophyllum*, *M. bimucronata* e *S. tomentosa*, afim de selecionar os rizóbios mais eficientes na promoção do crescimento das mesmas para posteriores ensaios de revegetação visando a recuperação das áreas de restinga degradadas do PAERV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de rizóbios autóctones da restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho em espécies de leguminosas nativas com potencial de emprego em programas de revegetação de áreas degradadas do Parque.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a nodulação de leguminosas arbóreas inoculadas com rizóbios autóctones de áreas de restinga do PAERV;
- ✓ Avaliar os efeitos da inoculação de rizóbios autóctones sobre o crescimento das plantas leguminosas nativas do PAERV;
- ✓ Avaliar os efeitos da inoculação de rizóbios autóctones de áreas de restinga sobre o teor e acúmulo de nitrogênio nas plantas;
- ✓ Determinar a eficiência simbiótica de rizóbios e leguminosas autóctones do PAERV;
- ✓ Selecionar rizóbios autóctones eficientes na promoção do crescimento de leguminosas nativas do PAERV;
- ✓ Identificar os rizóbios capazes de nodular as leguminosas e que apresentam elevada eficiência simbiótica.

4. HIPÓTESE

- ✓ A utilização de rizóbios autóctones contribui para um maior desenvolvimento de espécies de leguminosas nativas do PAERV;
- ✓ Os rizóbios autóctones de áreas de restinga apresentam respostas distintas em relação as diferentes espécies de leguminosas nativas.

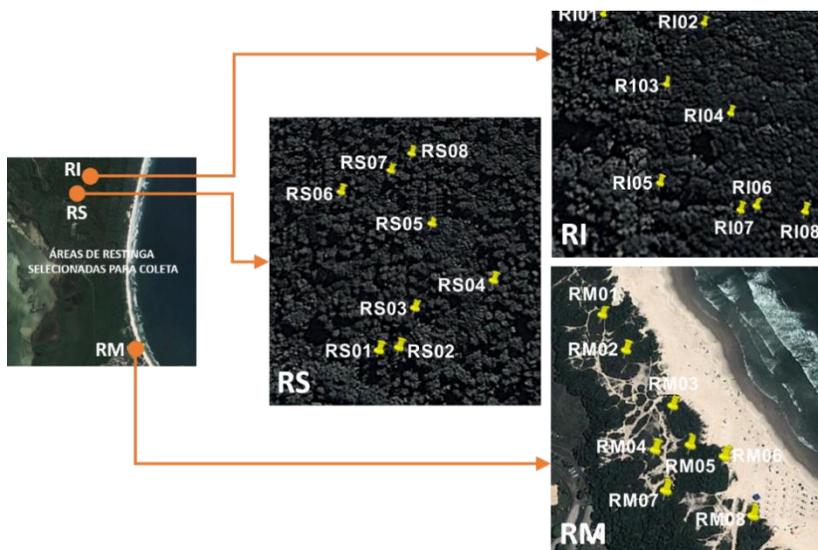
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Rizóbios selecionados

Para os testes de compatibilidade, eficiência simbiótica e promoção do crescimento vegetal de espécies leguminosas nativas, foram avaliados 12 isolados de rizóbios pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Santa Catarina. Esses isolados foram obtidos como resultado dos estudos de isolamento de rizóbios de áreas de restinga do PAERV (CANEI, 2014), onde foram realizadas coletas de solo em três áreas de restinga do PAERV: duas áreas de restinga arbórea em estágio avançado de regeneração, uma que sofre inundações ocasionais (restinga sujeita a inundação - RI) e outra não inundável (restinga seca - RS) e uma área de restinga herbácea sob influência marinha (restinga marinha - RM) (Figura 5).

Como resultado obteve-se 61 isolados de rizóbios da RM, 27 de RS e nove em RI, sendo diferenciadas 32 bactérias. Dos isolados obtidos foram selecionados 12 da área RS para serem utilizados nesse trabalho, pois é a área com maior incidência de *Pinus* spp. e que apresentou características químicas específicas, conforme analisado por Canei (2014). Dessa forma foram utilizados nesse trabalho os isolados: RS129, RS133, R137, RS139, R140, RS141, RS149, RS151, RS153, RS155, RS156 e RS158.

Figura 5. Pontos de coleta das amostras de solo nas áreas de restinga do PAERV, Florianópolis, SC. RM – restinga marinha; RI – restinga sujeita a inundação; RS – restinga seca. Números de um a oito referem-se as amostras coletadas de cada restinga. (Fonte: CANEI, 2014).



5.2 Leguminosas arbóreas

As plantas que foram empregadas nesse trabalho são três espécies da família Leguminosae nativas do PAERV e que apresentam características importantes tais como: crescimento rápido, capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios e potencial de uso em programas de revegetação de áreas degradadas. São elas: *Mimosa bimucronata* (maricá), *Dalbergia ecastophyllum* (marmelo-do-mangue) e *Sophora tomentosa* (feijão-da-praia).

5.3 Meios de cultura e soluções nutritivas

Para o crescimento dos isolados de rizóbio foi utilizado o meio de cultura Extrato de levedura-manitol (YM) (VINCENT, 1970) contendo

(em g L⁻¹): manitol 10,0; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄.H₂O 0,2; NaCl 0,1 e extrato de levedura 0,5.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,8, com solução 1 mol L⁻¹ de HCl ou NaOH e, em seguida, esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para manutenção das condições nutricionais para o desenvolvimento das leguminosas nativas durante os ensaios foi utilizada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). A solução com alta concentração de N (C/N) (52,5 mg L⁻¹) conteve: 136,08 mg L⁻¹ de KH₂PO₄; 550, 56 mg L⁻¹ de KNO₃; 1,0 g L⁻¹ Ca(NO₃)₂; 240,72 mg L⁻¹ de MgSO₄; solução de micronutrientes [(em mg L⁻¹) H₃BO₃ 2,86; MnCl₂ 1,81; ZnSO₄.7H₂O 0,22; CuSO₄.5H₂O 0,08; NaMO.4H₂O 0,02] e Fe-EDTA [(em mg L⁻¹) FeSO₄.7H₂O 24,1; EDTA 25,1]. A composição da solução com baixa concentração de nitrogênio (B/N) (5,25 mg L⁻¹) consistiu na substituição de KNO₃ e Ca (NO₃)₂ por 372,8 mg L⁻¹ de KCl e 554,92 mg L⁻¹ de CaCl₂. O pH das soluções foi ajustado para 6,5 e posteriormente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

5.4 Compatibilidade, eficiência simbiótica dos rizóbios e promoção do crescimento vegetal

Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de nodulação e eficiência simbiótica para as leguminosas nativas. Para tanto, foram conduzidos ensaios em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado (com quatro repetições) composto de 12 tratamentos de inoculação (12 isolados de rizóbios do PAERV), além de dois tratamentos controle sem inoculação: um com baixa concentração de nitrogênio 5,2 mg L⁻¹ N e outro com alta concentração de nitrogênio mineral 52,5 mg L⁻¹ (considerado o N necessário para o bom desenvolvimento das plantas), totalizando 14 tratamentos.

Previamente ao plantio, sementes de *D. ecastophyllum*, *M. bimucronata* e *S. tomentosa* (Figura 6) foram desinfestadas com imersão em hipoclorito de sódio 2% por dois minutos e após, lavadas seis vezes em água destilada estéril (GARSABALL e CUEVAS, 2006). Posteriormente, foram colocadas em câmara úmida até que estivessem pré-germinadas.

Figura 6. Sementes das leguminosas utilizadas no presente trabalho – (A) *D. ecastophyllum*; (B) *M. bimucronata*; e *S. tomentosa* (C).



Previamente ao plantio o solo permaneceu incubado a temperatura ambiente por um período de 30 dias para redução dos níveis de Mg do solo. Amostras de solo da RS também foram submetidas a caracterização química (TEDESCO et al., 1995) (Tabela 1) no Laboratório de Classificação e Manejo de Solos – CCA, UFSC, Florianópolis, SC. Foram semeadas quatro sementes em tubetes de 280 cm³ que continham solo estéril (esterilizado 2x em autoclave por uma hora a temperatura de 120 °C, (o intervalo das autoclavagens foi de 15 dias para eliminar possíveis endósporos e esporos que sobreviveram a primeira autoclavagem) que foi coletado das áreas de RS do PAERV.

Tabela 1. Atributos físico-químicos de amostras de solo coletadas na Restinga Seca (RS) do PAERV, Florianópolis, SC.

Atributos químicos do solo					
MO (g kg ⁻¹)	P (mg Kg ⁻¹)	pH H ₂ O	Ca (cmolc kg ⁻¹)	Mg (cmolc kg ⁻¹)	K (cmolc kg ⁻¹)
23,9	0,76	4,65	1,94	0,48	0,01
Al (cmolc kg ⁻¹)	H+Al (cmolc kg ⁻¹)	CTC	CTCef	Al%	V%
0,04	3,71	6,18	2,47	1,72	39,26
Textura, g kg⁻¹					
Areia		Silte		Argila	
971		10		19	

Em que: MO = matéria orgânica, P = fósforo, Ca = cálcio, Mg = magnésio, K = potássio, Al = alumínio, CTC = capacidade de troca de cátions, CTCef = CTC efetiva, V% = saturação por bases.

As análises químicas do solo mostraram que o pH dessa área é muito ácido (4,65), apresenta baixa quantidade de matéria orgânica (2,39 %) e baixo teor de P (0,76 mg Kg⁻¹), evidenciando uma baixa fertilidade no solo dessa área da restinga.

No momento da semeadura das leguminosas nos tubetes foi inoculado 1 mL das BFN pré-crescidas em meio YM durante 48 horas em incubadora com agitação orbital a 150 rpm a 28 °C, até atingir Densidade Ótica (DO) de 0,5, a qual foi avaliada em espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105 (Piracicaba, Brasil) a 540 nm.

Com a finalidade de evitar possíveis contaminações no momento de aplicar água e solução nutritiva esterilizadas nas plantas, após a emissão da segunda folha cotiledonar, foi fixado dentro de cada tubete, uma ponteira de 1,5 mL para a aplicação da solução nutritiva e água. Em seguida, foi colocada uma fina camada de uma mistura de areia esterilizada, clorofórmio e parafina (10 kg, 900 mL e 10 g, respectivamente) com a mesma finalidade, evitar contaminações (Figura 7).

Figura 7. Indivíduos das espécies empregadas nesse trabalho em tubetes em casa de vegetação com a camada de areia esterilizada, clorofórmio e parafina e a ponteira de 1,5 mL para evitar contaminações na aplicação das soluções nutritivas. - (A) *D. ecastophyllum*; (B) *M. bimucronata*; e (C) *S. tomentosa*.



Na condução do experimento, a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) foi aplicada duas vezes na semana (5 mL) e nos demais dias da semana foi aplicado 5 mL de água esterilizada.

Duas semanas após a emissão das plântulas, foi realizado um desbaste permanecendo apenas um indivíduo por tubete.

Durante um período de 120 dias para as espécies *M. bimucronata* e *S. tomentosa* e 90 dias para *D. ecastophyllum*, foi aplicado as soluções nutritivas respectivas aos tratamentos e água estéril no período já descrito anteriormente. Foram também realizadas observações diárias, durante as quais os experimentos foram monitorados e fotografados.

Após os 120 dias de crescimento das plantas (*M. bimucronata* e *S. tomentosa*) e 90 dias (*D. ecastophyllum*), foi mensurado a altura para determinação da promoção de crescimento das mesmas. Posteriormente, as plantas foram colhidas e verificado se houve nodulação por meio de uma inspeção visual das raízes. Foi determinado o número de nódulos (NN) por contagem. A massa seca de nódulos (MSN), produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca das raízes (MSR) por pesagem após secagem em estufa a 65 °C até terem obtido massa constante.

Foi determinado o teor de nitrogênio da parte aérea das plantas por meio do método semi-micro Kjeldahl, de acordo com Sarruge e Haag (1979). O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio com a respectiva produção de matéria seca da parte aérea. A eficiência simbiótica dos isolados de BFN foi calculada segundo a fórmula (CHAGAS-JÚNIOR et al., 2009):

$$ES = \frac{(N \text{ total fixado} - N \text{ total T sem N})}{(N \text{ total T com N} - N \text{ total T sem N})} \times 100$$

Onde ES = eficiência simbiótica; N total fixado = acúmulo de nitrogênio foliar do tratamento inoculado; N total T sem N = acúmulo de nitrogênio foliar do tratamento sem aplicação de N; N total T com N = acúmulo de nitrogênio foliar do tratamento com aplicação de N.

5.5 Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rRNA 16S

Os isolados de rizóbio autóctones que apresentaram compatibilidade e maior eficiência simbiótica para as leguminosas testadas foram identificados por meio da amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S pelo método Sanger et al. (1977). Inicialmente os isolados de rizóbios foram repicados em 50 mL de meio YM (VINCENT, 1970) e incubados a 25 °C, sob agitação a 150 g em mesa agitadora (MA 830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por cerca de três dias.

5.5.1 Extração de DNA

A partir do crescimento bacteriano em meio YM (VINCENT, 1970) foi feita a extração de DNA pelo método CTAB 2 % (DOYLE e DOYLE, 1990). Previamente à extração de DNA, 1 mL de cada inóculo foram transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200 µL de tampão de lise CTAB (CTAB 2 %, NaCl 5M, Tris – HCl 1M, EDTA 0,5M, água esterilizada) sendo posteriormente submetido a lise mecânica por maceração com pistilo estéril. Foram acrescentados mais 400 µL de tampão de lise e 1,2 µL de β-mercaptoetanol (0,2 % do volume final de tampão de lise). As amostras foram homogeneizadas gentilmente por 5 segundos, congeladas e incubadas a 65 °C, sendo esse procedimento repetido duas vezes. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65 °C por uma hora.

Após incubação foi adicionado solução de de 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por inversão por 5 minutos e centrifugado por 15 minutos a 12.000 g. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionados 300 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e incubados a -20 °C por 24 horas.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se então, 500 µL de etanol (EtOH) 70 % gelado, invertendo várias vezes. Foi novamente centrifugado por 15 minutos a 12.000 g e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram secos invertidos em papel toalha por 20 minutos. O pellet seco foi ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q.

5.5.2 Amplificação das amostras

Após a extração do DNA o gene RNAr 16S dos isolados foi amplificado a partir da utilização dos iniciadores universais para bactérias 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1541R (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') (DUHAMEL et al., 2002).

A amplificação foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 3 mmol⁻¹ de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 5 p mol dos iniciadores e 10 ng de DNA; Taq, 0,5 µL (5 U/ µL) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). As condições de amplificação da PCR foram 94 °C por 3 min; 30 ciclos de 45 seg a 94 °C; 30 seg a 55 °C; 90 seg a 72 °C; e extensão final por 7 min a 72 °C em termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

A amplificação foi verificada a partir de eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %, utilizando-se tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e “Sybr Green” para coloração das amostras (Life Technologies, São Paulo, Brasil). As concentrações das amplificações foram avaliadas em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Os amplicons foram purificados usando o kit Invisorb Fragment Cleanup (Invitek, Berlim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

O processo de sequenciamento foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), CCA/UFSC, Florianópolis, SC. Após a purificação dos amplicons, o gene rRNA 16S dos isolados foi amplificado a partir da utilização do iniciador universal para bactérias 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3').

A amplificação foi feita em água ultrapura estéril, 13 µL; big dye terminator, 1 µL; tampão BDT 5x, 5 µL; amplicons purificados, 1 µL; e primer, 2,0 µL (10 pmolµL). As condições de amplificação da PCR foram 94 °C a 15 segundos; 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos; temperatura de anelamento a 5 segundos e extensão a 62 °C por 4

minutos; não houve extensão final, em termociclador Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

Após a amplificação foi realizada uma nova purificação. Adicionou-se para cada amostra: 2 μ L de EDTA 125 mM e 60 μ L de etanol 100 %. As amostras foram ressuspensas com o uso de uma ponteira, a placa foi então selada com um adesivo para evitar perda de amostra no momento da centrifugação, e foi incubada no escuro por 15 min a temperatura ambiente. Após, foi centrifugada numa centrifuga Eppendorf 2250R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 45 min, - 4 °C, 4000 g. Foi retirada da centrifuga e invertida para eliminação do sobrenadante. A placa foi mantida invertida e levada novamente a centrifuga nessa posição e colocada sobre folhas de papel toalha e foi feito um spin por 5 s. Adicionou-se, 60 μ L de etanol 70 %, e centrifugada por 15 min, - 4°C, 4000 g. A placa foi novamente invertida para retirar o sobrenadante. Após foi feito novamente um spin por 5 seg. A placa foi deixada secando por 90 min no escuro para completa eliminação do etanol. Foi adicionado 10 μ L de formamida e para completa desnaturação foi deixada descansando por 40 min. A placa foi transferida para o sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). O tempo médio da corrida de cada injeção foi de aproximadamente 2 horas.

As sequências obtidas foram processadas e comparadas com as sequências depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As comparações foram feitas usando BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). Foi selecionado no banco de dados a opção RNAr 16S (Bacteria e Archaea), e foram selecionadas apenas sequências muito semelhantes.

5.6 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram submetidos às provas de normalidade e homogeneidade. Após, foram realizadas análises de variâncias (ANOVA) para cada ensaio e posteriormente os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para isso, foi utilizado o programa estatístico Assistat versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016). Foi realizado o Coeficiente de Correlação de Pearson para cada uma das espécies em relação aos parâmetros NN, MSN, MSPA e MSR, com o intuito de entender melhor a relação entre eles. Assim como o Coeficiente de Correlação de Pearson,

os gráficos, foram feitos utilizando o software SigmaPlot 12.5 (SPSS, Chicago).

6. RESULTADOS

6.1 Nodulação em leguminosas inoculadas com rizóbios autóctones de restinga

Por meio da inspeção visual das raízes das três espécies utilizadas nesse trabalho, não foi constatado presença de nódulos nos tratamentos controle não inoculado (C/N e B/N), que é um indicativo de que não ocorreu contaminação nos experimentos. Em *S. tomentosa* e *M. bimucronata* houve presença de nódulos em ambas as espécies e em todos os tratamentos inoculados. Em *D. ecastophyllum*, apenas sete dos doze isolados apresentaram compatibilidade simbiótica, sendo eles: R129, R133, R140, R141, R149, R151 e R155 (Figura 8).

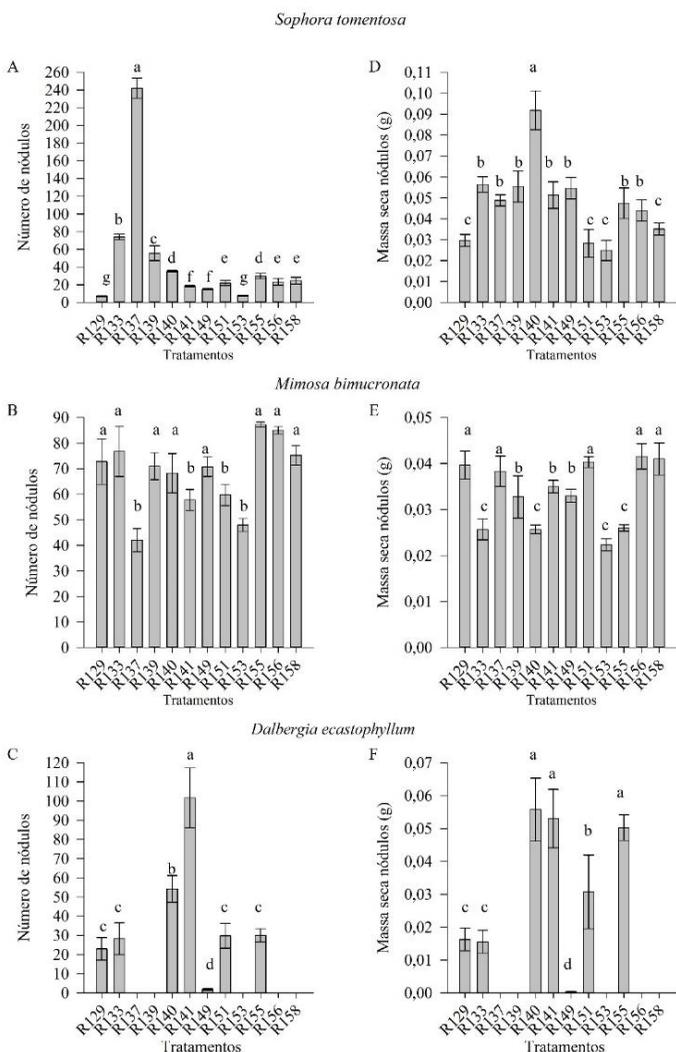
Em *S. tomentosa* o tratamento inoculado com o isolado R137 teve um incremento em relação ao número de nódulos de 227 % em relação ao tratamento R133, e de 336 % em comparação com o isolado R139 (Figura 8A). Em referência aos tratamentos que apresentaram menor número de nódulos R129 e R153, o isolado R137 apresentou um aumento de 3181%.

Para *M. bimucronata* os tratamentos inoculados com os R129, R133, R139, R140, R149, R155, R156 e R158, aumentaram em média 46 % o número de nódulos em comparação com os tratamentos R137, R141, R151 e R153 (Figura 8B).

O tratamento inoculado com o isolado R141, apresentou um aumento médio de 88 % no número de nódulos em relação ao isolado R140 em *D. ecastophyllum* (Figura 8C). Em comparação com os isolados R129, R133, R151 e R155, o incremento no número de nódulos pelo isolado R141 foi de 267 %. O aumento de número de nódulos dos isolados R129, R133, R151 e R155 sob o tratamento R149, que apresentou o menor número de nódulos, foi de 1486 % (Figura 8C).

A massa seca dos nódulos (MSN) em *S. tomentosa* foi maior para o tratamento R140, que apresentou um incremento médio na massa seca dos nódulos de 80 % em relação aos tratamentos inoculados R133, R137, R139, R141, R149, R155 e R156 e de 211 % em comparação com os tratamentos R129, R151, R153 e R158 que apresentaram a menor média de MSN (Figura 8D). Na *M. bimucronata* (Figura 8E) os maiores valores médios de MSN foram observados em R129, R137, R151, R156 e R158, que representaram um aumento médio em relação aos tratamentos R133, R153 e R155 de 63 % (Figura 8E). Em *D. ecastophyllum* os isolados R140, R141 e R155 apresentaram um acréscimo de 72 % em referência ao isolado R151, e de 234 % em relação aos isolados R129 e R133 (Figura 8F).

Figura 8. Número [A (CV% = 6,0), B (CV% = 16,0) e C (CV% = 20,3)] e Massa seca de nódulos [D (CV% = 24,2), E (CV% = 14,9) e F (CV% = 22,3)] produzidos em *S. tomentosa*, *M. bimucronata* e *D. ecastophyllum* respectivamente, nos tratamentos inoculados que foram compatíveis com cada uma das espécies, após 120 dias (*S. tomentosa* e *M. bimucronata*) e 90 dias (*D. ecastophyllum*) de crescimento. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 4$).



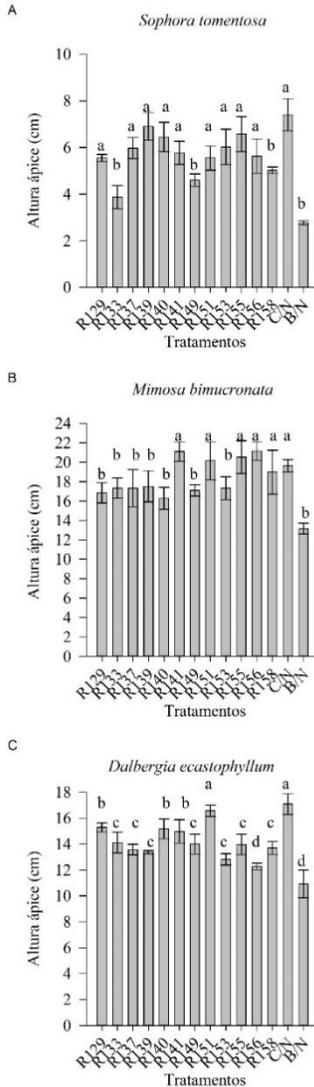
6.2 Efeitos da inoculação sobre o crescimento das leguminosas nativas inoculadas com rizóbios autóctones

Em relação ao crescimento da parte aérea (altura ápice) em *S. tomentosa*, os tratamentos inoculados com os isolados de rizóbios R129, R137, R139, R140, R141, R151, R153, R155, R156 e o controle C/N foram os que apresentaram melhores resultados com um acréscimo mde 54 % no crescimento da parte aérea em relação aos tratamentos inoculados R133, R149, R158 e controle B/N (Figura 9A).

Os isolados que mais influenciaram no crescimento de *M. bimucronata* foram os isolados R141, R151, R155, R156, R158 e o controle C/N, que apresentaram um incremento médio de 19 % em comparação com os isolados R129, R133, R137, R139, R140, R149, R153 e o tratamento controle B/N (Figura 9B).

Para *D. ecastophyllum*, os isolados que mais influenciaram no seu crescimento foi o isolado R151 que apresentou compatibilidade simbiótica e não diferiu do controle C/N, seguido dos isolados R129, R140 e R141. O isolado R151 apresentou um aumento de 42 % no crescimento da parte aérea em relação aos isolados R156 e controle B/N (Figura 9C).

Figura 9. Crescimento da parte aérea de *S. tomentosa* (A) (CV% = 19,2), *M. bimucronata* (B) (CV% = 17,1) e (C) *D. ecastophyllum* (CV% = 9,3), tratamentos inoculados e controles com C/N e B/N após 120 dias (*S. tomentosa* e *M. bimucronata*) e 90 dias (*D. ecastophyllum*) de crescimento. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott (P < 0,05). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4).



É possível observar uma imagem de cada tratamento inoculado em comparação com o tratamento C/N e B/N para *S. tomentosa* (Figura 10), *M. bimucronata* (Figura 11) e *D. ecastophyllum* (Figura 12) (foi escolhida para a imagem a repetição que melhor representava o tratamento).

Figura 10. *S. tomentosa* - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com B/N e C/N.

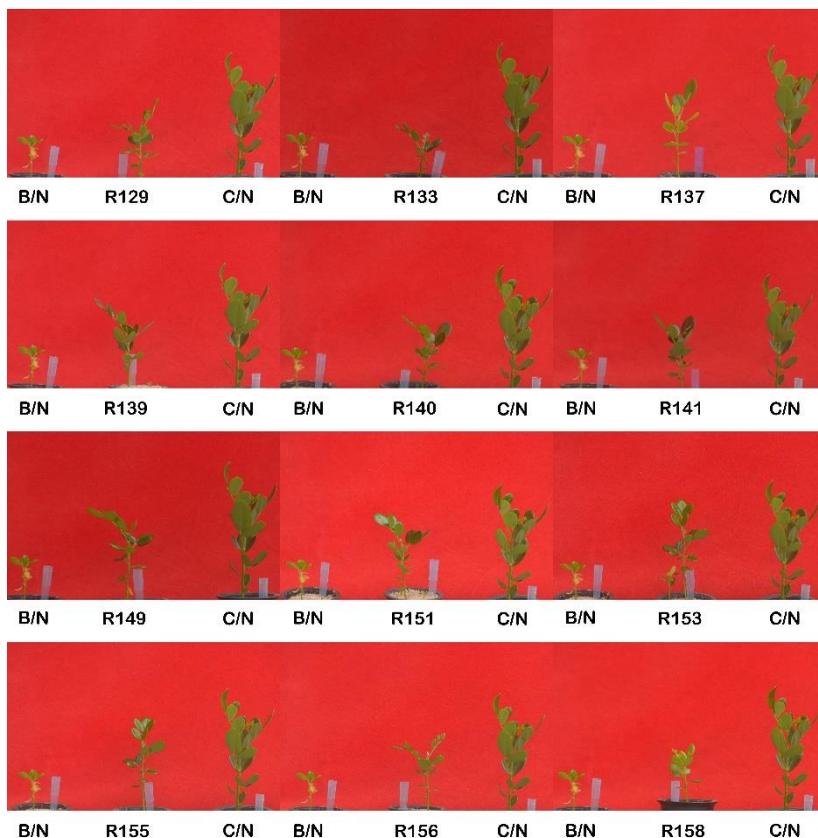


Figura 11. *M. bimucronata* - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com B/N e C/N.

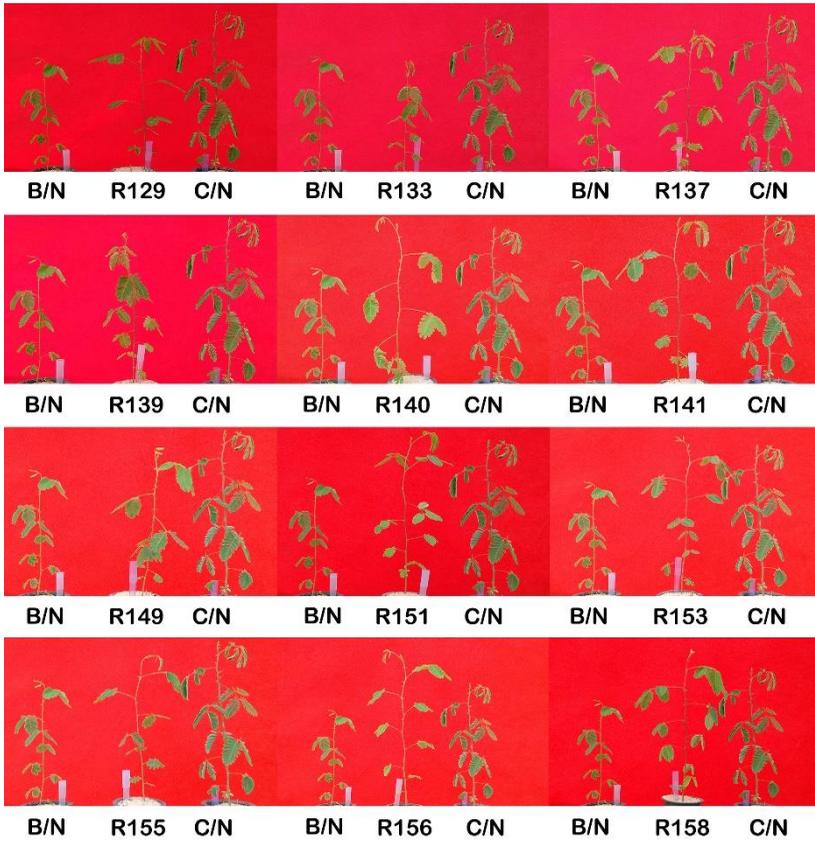
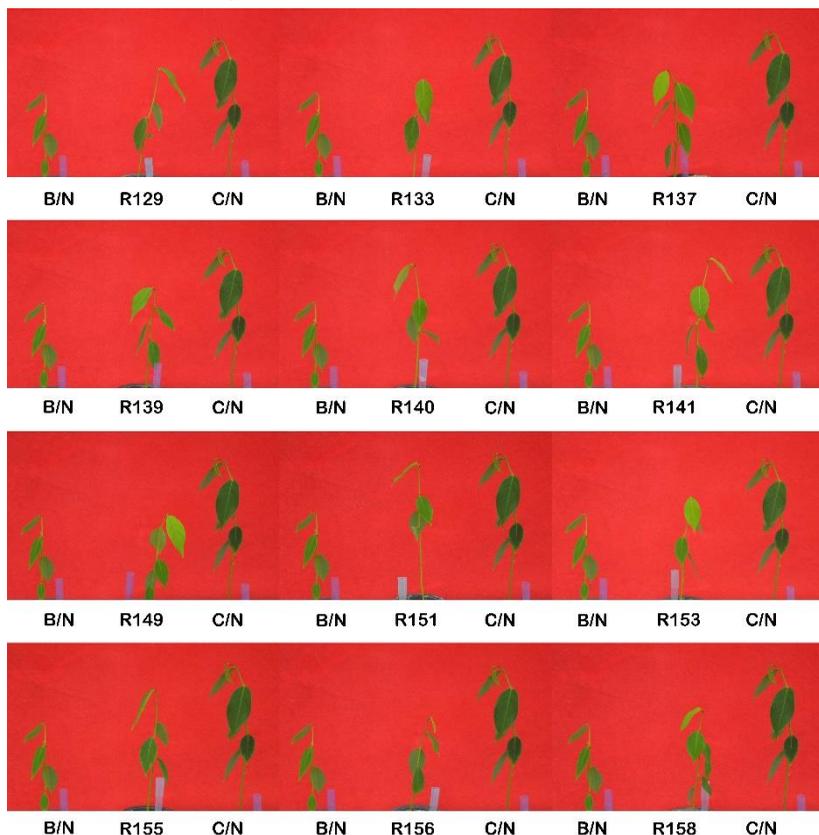


Figura 12. *D. ecastophyllum* - cada um dos tratamentos inoculados em comparação com os tratamentos controle com baixo teor de nitrogênio (B/N) e com alto teor de nitrogênio (C/N).



A maior produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) em *S. tomentosa* e *M. bimucronata* foram verificadas nas plantas controle C/N (Figura 13). Em *S. tomentosa* a inoculação com o isolado R155 aumentou em 900 % a produção de MSPA em relação ao tratamento B/N. Os isolados R139, R140, R141, R153 e R156 também influenciaram significativamente na biomassa da parte aérea em comparação com o tratamento B/N, com um aumento de 632 %. Os tratamentos inoculados R133, R149, R151 e R158 apresentaram um

acúmulo de biomassa na parte aérea de 358 % em relação ao controle B/N (Figura 13A).

Em *M. bimucronata* os tratamentos inoculados R129, R139, R141, R151, R156 e R158 tiveram um incremento de 157 % na MSPA em comparação com o controle B/N. Os isolados R133, R137, R149, R153 e R155 apresentaram um incremento de 114 % em referência ao controle B/N, e o isolado R140, 64,28 % (Figura 13B).

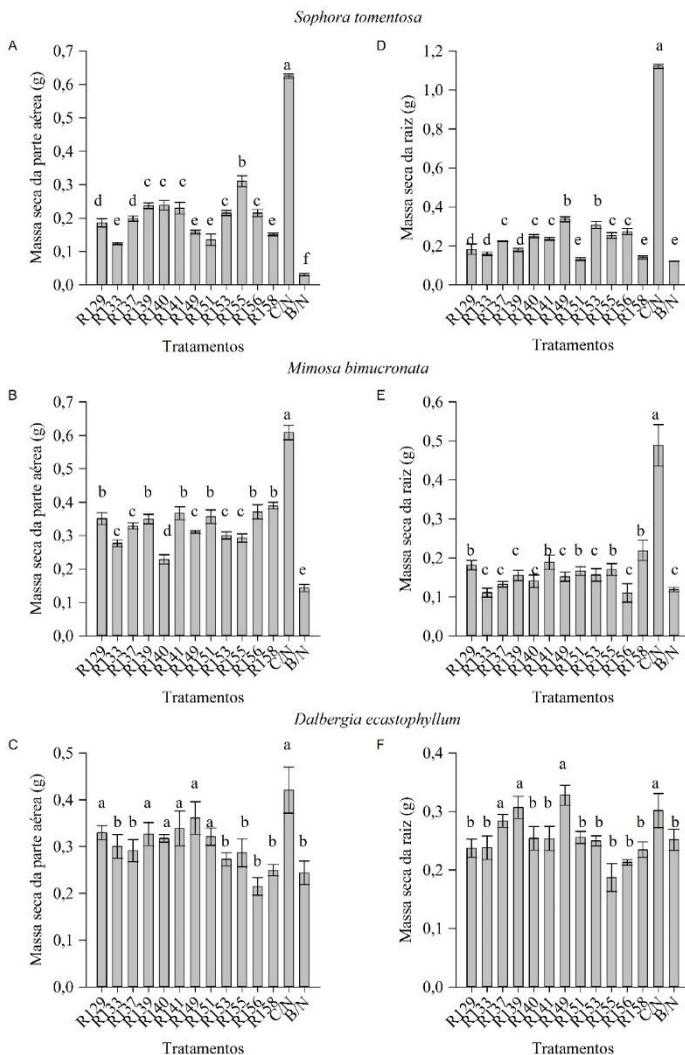
Para *D. ecastophyllum*, os isolados compatíveis com a espécie R129, R140, R141, R149, R151 não diferiram do tratamento R139, que não foi compatível simbioticamente com ela, e apresentaram a mesma média que o controle C/N. O incremento médio na MSPA nesses tratamentos em relação aos demais tratamentos e controle B/N, foi de 48 % (Figura 13C).

Em relação a massa seca da raiz (MSR) em *S. tomentosa*, os tratamentos R149 e R153 mostraram um acréscimo médio de 144 % em relação aos tratamentos inoculados R151, R158 e o controle B/N (Figura 13D).

Para *M. bimucronata*, os tratamentos R129, R141, R151, R155 e R158 indicaram um incremento de 46 % na MSR em relação ao controle B/N e do demais tratamentos inoculados (Figura 13E).

Dos isolados que mostraram compatibilidade simbiótica com *D. ecastophyllum*, apenas o isolado R149 mostrou um incremento na MSR em relação ao controle B/N, sendo de 29 %, não diferindo dos tratamentos R137, R139 e controle C/N (Figura 13F).

Figura 13. Massa seca da parte aérea (A) *S. tomentosa* (B) *M. bimucronata* e (C) *D. ecastophyllum*, e Massa seca da raiz (D) *S. tomentosa*, (E) *M. bimucronata* e (F) *D. ecastophyllum*, inoculadas com isolados rizóbios e os controles C/N e B/N, após 120 dias (*S. tomentosa* e *M. bimucronata*) e 90 dias (*D. ecastophyllum*) de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 4).



Como pode ser observado na Tabela 2, em *S. tomentosa* nenhum dos parâmetros (NN, MSN, MSPA e MSR) apresentaram correlação significativa entre si pelo Coeficiente de Correlação de Pearson. Já para *M. bimucronata*, a MSN e a MSPA apresentaram correlação positiva. E em *D. ecastophyllum*, o número de NN e MSN apresentou correlação significativa, assim como a MSPA e a MSR.

Tabela 2. Coeficiente de Correlação de Pearson entre os atributos relacionados a nodulação e crescimento em *S. tomentosa*, *M. bimucronata* e *D. ecastophyllum*.

<i>S. tomentosa</i>	<i>MSN</i>	<i>MSPA</i>	<i>MSR</i>
NN	0,139	-0,0373	-0,109
MSN	-	0,329	0,166
MSPA	-	-	0,350
<i>M. bimucronata</i>			
NN	-0,0499	0,0388	-0,0180
MSN	-	0,658*	0,296
MSPA	-	-	0,392
<i>D. ecastophyllum</i>			
NN	0,719*	0,283	-0,168
MSN	-	-0,0452	-0,376
MSPA	-	-	0,626*

* $p < 0,05$

Em que: NN= número de nódulos; MSN= massa seca de nódulos; MSPA= massa seca da parte aérea; MSR= massa seca da raiz.

S. tomentosa (n = 48); *M. bimucronata* (n = 48); e *D. ecastophyllum* (n = 28). Em que n = número de unidades amostrais avaliadas.

6.3 Efeitos da inoculação de rizóbios autóctones sobre o teor e acúmulo de nitrogênio em leguminosas nativas

O teor de N foi maior para o tratamento controle C/N nas espécies *M. bimucronata* e *D. ecastophyllum*. Já o acúmulo de nitrogênio (AN) nas três espécies utilizadas nesse trabalho foi maior no tratamento C/N.

O teor de nitrogênio (TN) na parte área em *S. tomentosa* foi influenciado pelos tratamentos, no entanto, os tratamentos inoculados apresentaram um teor de N 90 % inferior ao tratamento B/N (Figura 14A). No acúmulo de N na parte aérea (Figura 14D) verificou-se nos tratamentos R139, R141 e R155 um incremento médio de 371 % em relação ao controle B/N. Os tratamentos R129, R137, R140 e R156 também apresentaram níveis intermediários de 261 %, e os tratamentos R133, R149, R151, R153 e R158 foram os que apresentaram um menor incremento no acúmulo de N, com 164 % em comparação com B/N.

O TN e AN na parte aérea na *M. bimucronata* foi favorecida significativamente pelos tratamentos de inoculação (Figura 14). A inoculação com os isolados de rizóbios R141, R155 e R158 foram os que apresentaram as maiores médias de teor de N, não diferindo entre si (Figura 14B). Esses isolados propiciaram um incremento médio de teor de 35 % em relação ao tratamento B/N. Os tratamentos inoculados com os isolados de rizóbios R139, R140, R153 e R156 não diferiram do tratamento B/N. O AN na parte aérea em *M. bimucronata* também foi favorecido pela inoculação (Figura 14E). Os tratamentos que apresentaram maior AN na *M. bimucronata* foi o R141 e o R158, com um incremento médio de 261 % em relação ao controle B/N. Os tratamentos inoculados R133, R140 e R153 apresentaram um incremento de 101 % em comparação com B/N.

Em *D. ecastophyllum*, o teor de N nos tratamentos que apresentaram compatibilidade R133 e R155, não diferiram estatisticamente dos tratamentos R137, R153, R156 e R158, e apresentaram um aumento de apenas 12 % no TN em relação aos demais tratamentos compatíveis ou não, e o tratamento controle B/N (Figura 14C). O AN na parte aérea por sua vez, não apresentou diferenças entre os tratamentos inoculados e controle B/N, indicando um valor de 170 % inferior ao controle C/N (Figura 14F).

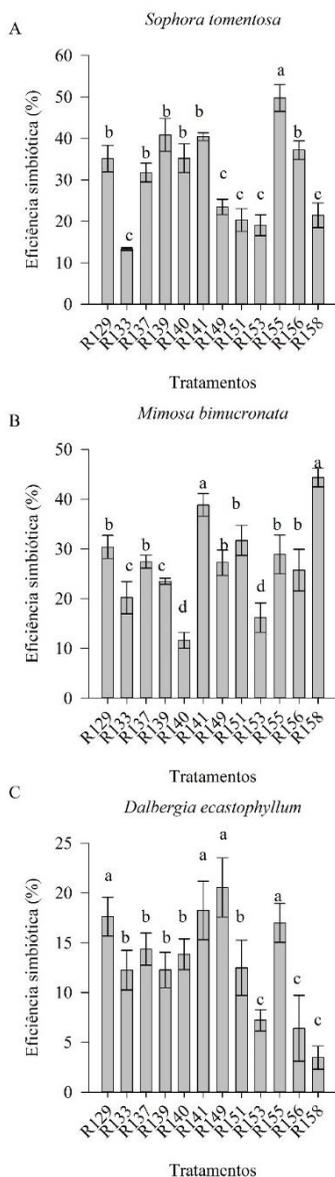
6.4 Eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios autóctones em leguminosas

A partir dos dados de crescimento e acúmulo de N foi possível calcular a eficiência simbiótica dos isolados (Figura 15). A maior eficiência para *S. tomentosa* foi obtida por meio da inoculação da isolado de rizóbio R155 (Figura 15A), seguido pelos isolados R129, R137, R139, R140, R141 e R156. Os isolados menos eficientes foram o R133, R149, R151, R153 e R158.

Para *M. bimucronata*, os isolados que se mostraram mais eficientes foram o R141 e o R158 (Figura 15B). Sendo que os isolados R129, R137, R149 R151, R155 e R156 também apresentaram eficiência simbiótica na fixação do N. Os isolados que se apresentaram menos eficientes foi o R140 e o R153 (Figura 15B).

Já para *D. ecastophyllum*, os tratamentos inoculados que apresentaram melhor desempenho para a espécie foram os isolados de rizóbios R129, R141, R149 e R155, entretanto os valores para eficiência foram inferiores a 25 % (Figura 15C).

Figura 15. Eficiência simbiótica de rizóbios para *S. tomentosa* (A) (CV% = 17,4), *M. bimucronata* (B) (CV% = 19,8) e *D. ecastophyllum* (C) (CV% = 34,0). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 4$).



6. 5 Sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados mais eficientes simbioticamente

A partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S dos isolados de rizóbios mais eficientes simbioticamente, os isolados foram classificados nas classes α -Protobacteria, β -protobacteria e Bacilli. Foi apontado um isolado como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (R155) dentro das α -Protobacteria. Na classe β -protobacteria identificou-se um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* (R141). E pertencente a classe Bacilli, três isolados do gênero *Paenibacillus* (R129, R149 e R158) (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação das estirpes isoladas em solos de restinga do PAERV, Florianópolis, SC, mais eficientes simbioticamente em *S. tomentosa* (R155), *M. bimucronata* (R141 e R158) e *D. ecastophyllum* (R129, R141, R149 e R155).

Estirpe	Sequência mais similar encontrada no		
	GenBank	Espécie	SI (%)
R129	840	<i>Paenibacillus</i>	100
R141	780	<i>taichungensis</i>	99
R149	780	<i>Burkholderia</i> sp.	100
R155	780	<i>Paenibacillus</i> sp.	100
R158	770	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
		<i>Paenibacillus</i> sp.	

Em que: NPB = número de pares de bases; SI = porcentagem de similaridade encontrada no GenBank.

7. DISCUSSÃO

7.1 Nodulação em leguminosas inoculadas com rizóbios autóctones de restinga

A ocupação das restingas pelo homem, principalmente pela indústria imobiliária e introdução de espécies exóticas, tem acarretado sérios problemas ambientais para esse ecossistema, uma vez que se trata de um ambiente muito frágil e apresenta um solo com baixíssima fertilidade (RADAMBRASIL, 1983; HOLANDA, 1988; LEÃO e DOMINGUEZ, 200; ASSIS et al., 2004). A introdução de espécies exóticas como o *Pinus* spp. tem levado a perda de espécies, perda de habitats, e profundas modificações nos solos de restinga. Somente no Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), 82 % da vegetação que em sua maioria era formada originalmente por restingas, se encontra contaminada por espécies exóticas, principalmente por *Pinus* spp. Da área total do parque de 1532 hectares, 487 foram utilizados para o plantio das espécies *P. elliottii* e *P. taeda* (FERREIRA et al., 2009). A ocupação pelo *Pinus* spp. durante um espaço longo de tempo também levou a formação de uma densa camada de serapilheira. As acículas do *Pinus* spp. são de difícil degradação e possuem ceras cuticulares que reduzem o efeito da ação mecânica (STURGUSS, 1991) e o efeito antimicrobiano de compostos voláteis, como foi observado em *P. densiflora* (KIN e SHIN, 2005).

Para a recuperação e preservação das áreas de restinga faz-se necessário um plano de manejo visando a retirada das espécies de *Pinus* do PAERV. Além disso é importante o planejamento prévio para que a adoção de medidas sejam eficazes e de fato tragam bons resultados. A revegetação é uma alternativa de resposta rápida e que apresenta baixos custos em comparação com outros métodos para a recuperação do solo dessas áreas, principalmente quando empregadas espécies leguminosas, que apresentam uma série de características desejáveis e facilitadoras nessa ação tais como crescimento rápido e associação simbiótica com rizóbios (SCHIAVO, 2005; NASCIMENTO e BIONDI, 2008; SIQUEIRA et al., 2008; LASTE et al., 2008). No entanto, os trabalhos com microrganismos como os rizóbios são praticamente inexistentes nesse tipo de ecossistema, além de os trabalhos com microrganismos serem em sua maioria com espécies herbáceas e de interesse econômico, e não ambiental (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O presente trabalho apresenta caráter inovador em áreas de restinga, uma vez que busca por meio de experimentos a seleção de estirpes de rizóbios autóctones de modo a testar suas eficiências simbióticas em espécies nativas, buscando com isso a revegetação de áreas de restingas degradadas, seja por efeito da introdução de espécies exóticas com *Pinus* spp. ou por outras razões. Até o momento não há trabalhos que verificassem a eficiência simbióticas de estirpes nativas de restinga em *M. bimucronata*, *S. tomentosa* ou *D. ecastophyllum*.

Nesse trabalho, foram testadas 12 estirpes de isolados de rizóbios procedentes de uma área de restinga (RS) do PAERV. Portanto, estas estirpes são adaptadas nas condições de estresse desse ecossistema, como altos teores de sódio, condições de baixa fertilidade e pH ácido. A fim de obter condições mais reais ao campo, foi utilizado solo esterilizado dessas áreas para a experimentação em casa de vegetação com três espécies nativas de leguminosas que ocorrem tanto no PAERV, quanto em muitos ambientes de restinga no país.

Dessa forma, foi constatado nesse trabalho nas espécies de *S. tomentosa* e *M. bimucronata* que os 12 isolados testados apresentaram compatibilidade simbiótica. Para *D. ecastophyllum*, apenas 7 dos 12 isolados de rizóbios testados foram compatíveis, dessa forma é possível inferir que a mesma é mais exigente em relação aos simbioss, em comparação com as outras duas espécies estudadas. Os isolados R129, R133, R140, R141, R149, R151 e R155, foram mais generalistas quanto à capacidade de nodular, pois nodularam com as três espécies analisadas.

Em *M. bimucronata*, os valores encontrados para número de nódulos foram menores que os estimados por Moura et al (2016) e Araújo et al. (2017). Salienta-se, porém, que os valores encontrados pelos autores são referentes ao cultivo com substrato areia e vermiculita, e no presente trabalho foi utilizado solo de restinga, que pode ter influenciado de forma negativa a nodulação conforme será discutido posteriormente. Em um trabalho realizado por Lammel et al. (2015) com *M. bimucronata* e solos provenientes de diferentes sistemas de manejo (área plantada, área de mata nativa e área em estado de regeneração) como inoculante e substrato, observaram valores médios de 40 nódulos em solo de mata nativa, 20 em solo de plantio e 43 em solo em estágio de regeneração. Os valores encontrados por esses autores são muito mais próximos aos encontrados nesse trabalho, deixando mais evidente a influência do substrato utilizado.

Para *S. tomentosa*, alguns autores já observaram ou isolaram nódulos radiculares nessa espécie (OLIVEIRA, 2001; HUNG et al., 2005; STAEHELIN et al., 2006). Entretanto, são quase inexistentes trabalhos

que investigassem mais profundamente essa relação entre os simbiossomas com essa espécie. Staehelin et al. (2006), encontraram em *S. tomentosa* um número médio de 25 nódulos na inoculação com uma estirpe de *Rhizobium*, porém o período de condução dos experimentos foi menor (64 dias). Hung et al. (2005), observaram em experimentos com isolado proveniente de *S. tomentosa*, que não houve crescimento do microrganismo em pH ácido (3,5), entretanto em pH 12 o resultado foi positivo. O isolado também não foi tolerante a altas concentrações de NaCl (4,5 %).

Ogan (1990), observou em raízes de *D. ecastophyllum* coletadas em áreas de manguezal valores entre 247 e 1.261, muito maiores aos observados nesse trabalho, no entanto, as raízes das plantas analisadas por aqueles autores pertenciam a plantas em estágio de desenvolvimento avançado. Foi observado por Kumar et al. (2013), em *D. sissoo* diferenças no número de nódulos de acordo com a idade da planta.

O número de nódulos para todas as espécies avaliadas variou bastante em relação aos encontrados na literatura. Segundo Ferreira et al. (2012) o método utilizado para o cultivo de diferentes leguminosas e as condições ambientais nos quais os experimentos são conduzidos são os principais motivos de variação no número de nódulos.

Os fatores ligados a acidez do solo normalmente limitam as etapas de infecção das raízes, a formação de nódulos e, conseqüentemente, a assimilação de N pela planta (GRAHAM, 1992; PELEGRIN et al., 2009). Canei (2014), observou nas análises químicas do solo da RS, da qual foi coletado o solo utilizado nesse trabalho, altos valores de Na. Foi observado por Jouyban (2012) e Pinheiro et al. (2014), que altas concentrações desse elemento no solo afetam diretamente o crescimento do rizóbio, podendo ainda reduzir a nodulação inibindo a planta hospedeira, pois as plantas produzem altos níveis de etileno quando estão sob estresse, e esse etileno produzido funciona como um inibidor da nodulação.

A formação de maior quantidade de nódulos pelos isolados não necessariamente contribui para a maior produção de matéria seca desses, como foi observado na maioria dos tratamentos. Apenas em *D. ecastophyllum* foi observada uma correlação significativa entre esses dois parâmetros. Para *M. bimucronata*, apenas três dos isolados com maior número de nódulos apresentaram também maior MSN (R129, R156, R158). Lammel et al. (2015) também observaram que o número de nódulos não representou necessariamente maior massa seca. Em alguns tratamentos, apesar do pequeno número de nódulos, a massa seca foi alta

por se tratarem de nódulos grandes. Segundo Freitas et al. (2011), o número de nódulos explica pouco a eficiência da simbiose. Além do que, nódulos pequenos e não funcionais podem representar um dreno de fotoassimilados (ATKINS, 1984).

7.2 Efeitos da inoculação de rizóbios autóctones sobre o crescimento, teor e acúmulo de nitrogênio pelas leguminosas nativas

Nas três espécies utilizadas nesse trabalho foram observados incrementos no crescimento da parte aérea pela inoculação de rizóbios autóctones em relação ao controle B/N. Os diferentes isolados empregados, apresentaram taxas diferentes no crescimento das espécies empregadas. Destaque para os isolados R141 e R151, que se apresentaram entre as maiores médias em relação ao crescimento da parte aérea para todas as espécies avaliadas.

Alguns isolados apesar de terem apresentado os maiores incrementos no crescimento das espécies em relação aos demais isolados, não necessariamente tiveram a maior MSPA.

Para *S. tomentosa*, os valores encontrados para MSPA forma muito menores aos observados por Stoehelin et al. (2006), o qual observou valores em torno de 1,4 g em plantas inoculadas com estirpe de *Rhizobium*, no entanto as condições de substrato foram diferentes, o que pode ter facilitado um melhor desenvolvimento das plantas nesse último trabalho, como vimos anteriormente.

Em *M. bimucronata*, a maior altura observada, mostrou-se muito similar a encontrada por Moura et al. (2016), com tudo, este último o experimento teve uma duração maior que quatro meses.

Em *D. ecastophyllum*, os tratamentos inoculados em relação ao crescimento da parte aérea não diferiram de um dos tratamentos que não foi compatível. Os rizóbios podem influenciar positivamente o crescimento das plantas sem necessariamente formar nódulos, inclusive em espécies não leguminosas (SCHLINDWEIN et al., 2007; KOZUSNY-ANDREANI e ANDREANI-JÚNIOR, 2014). Kumar et al. (2013) observaram em *D. sissoo* inoculadas com estirpe de rizóbio e tratamentos com diferentes doses de N, um aumento significativo no crescimento da parte aérea da espécie com os tratamentos inoculados em relação ao tratamento controle B/N.

Em relação a MSR, Kudoyarova (1997), observou que o aumento de NO₃ nas plantas analisadas, influenciava no aumento dos níveis de ácido indol acético (AIA), que por consequência aumentava o

comprimento das raízes. Logo, a maior MSR observada nos tratamentos controle C/N, podem estar relacionados com a maior disponibilidade de N para essas plantas durante o experimento. Ademais, os tratamentos que apresentaram bons resultados para MSR, podem estar envolvidos na produção de AIA nessas plantas.

As rizobactérias promovem o crescimento vegetal por meio da produção de inúmeras substâncias que estimulam a absorção de elementos como o N, P e outros nutrientes importantes para o desenvolvimento dos tecidos vegetais (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; GLICK, 2012). Por ser a fixação biológica de nitrogênio um dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal mais amplamente estudados, foi estimada neste estudo, por meio do acúmulo de N.

Em *M. bimucronata*, os valores encontrados para TN para os melhores tratamentos inoculados foram muito semelhantes aos encontrados por Moura et al. (2016).

Não foi encontrado na literatura valores para teor de N para as espécies *S. tomentosa* e *D. ecastophyllum*, salientado mais uma vez, que este é o primeiro trabalho a avaliar esses parâmetros em ambas espécies, o que infelizmente não permite comparação em relação a esses fatores.

Os isolados de rizóbios R139, R141 e R155 em *S. tomentosa* e os isolados R141 e R158 em *M. bimucronata* promoveram incrementos no acúmulo de N na parte aérea das plantas e isso pode contribuir para o incremento desse nutriente em solos de áreas de restinga de baixa fertilidade. Já em *D. ecastophyllum*, não houve diferença entre os tratamentos isolados e o tratamento B/N para o NA, sendo necessário novos estudos que avaliem a FBN nessa espécie.

7.3 Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios do PAERV

Segundo Moreira e Siqueira (2006), a avaliação de um grande número de estirpes com relação a sua eficiência em determinada espécie hospedeira, sua adaptação a condições edáficas e ambientais, devem ser consideradas em relação à eficiência em fixar nitrogênio, pois são a base da seleção de estirpes para produção de inoculantes.

Pouco têm sido os estudos com o objetivo de investigar eficiência simbiótica de rizóbios em solos de restinga, inclusive com *M. bimucronata*, *S. tomentosa* e *D. ecastophyllum*, apesar do potencial de emprego dessas espécies em restauração de áreas degradadas.

Nesse trabalho, a eficiência simbiótica para leguminosas nativas foi restrita a poucos isolados autóctones de áreas de restinga. O tratamento

com o isolado R155 foi o mais eficiente simbioticamente para *S. tomentosa*, e também se apresentou entre as melhores médias em comparação com os demais controles inoculados em todos os parâmetros avaliados, corroborando ainda mais com o resultado de eficiência. Em *M. bimucronata*, o tratamento com o isolado R158 e R141 foram os mais eficientes, e também apresentaram a melhor média em comparação com os demais controles inoculados em todos os parâmetros avaliados, exceto nos parâmetros número NN e MSN o isolado R141 não foi um dos melhores, apesar de ter apresentado bons resultados.

Para *D. ecastophyllum*, os isolados de rizóbios R129, R141, R149 e R155, apesar terem sido os mais eficientes simbioticamente, não apresentaram valores muito elevados, sendo menores que 25 %. Entretanto, aumentaram significativamente o ganho de biomassa na parte área. A nodulação positiva em uma espécie, apesar de comprovar a condição simbiótica das estirpes, não garante a eficiência destas em fixar nitrogênio e promover o desenvolvimento do hospedeiro (COELHO, 2016; CLEVELAND et al., 1999), pois diversos fatores biológicos, químicos e físicos podem influenciar a FBN através de seus simbiossiontes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os rizóbios tropicais são formados por subgrupos com especificidade simbiótica e eficácia variada (GUIMARÃES et al., 2015; MARRA et al., 2012; SPRENT, 2003). Apesar de não serem encontradas estirpes eficientes em alguns casos com a inoculação de estirpes nativas, a avaliação dessas é necessária, pois serve como base para prever a necessidade de inoculação (TURK e KEYSER, 1992).

Considerando os resultados relacionados com a eficiência simbiótica, recomenda-se o isolado R155 para a inoculação da *S. tomentosa*, em *M. bimucronata* os isolados R141 e R158, e para *D. ecastophyllum* os isolados R129, R141, R149 e R155, na produção de mudas visando a revegetação de áreas de restingas impactadas pelo *Pinus*. Fazem-se necessários estudos futuros com esses isolados em condições controladas em solo não esterilizado que avaliem a capacidade competitiva desses isolados. E após essa etapa, realizar a avaliação a campo de modo a comprovar a eficiência simbiótica sob as influências climáticas.

7.4 Sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados mais eficientes simbioticamente

Cerca de um terço de todas as espécies e metade de todos os gêneros de Leguminosae no Brasil já foram avaliadas quanto a capacidade de nodulação, bem como as características fenotípicas de seus microssimbiontes, por meio de levantamentos em viveiros e a campo (MAGALHÃES et al., 1982; FARIA et al., 1989; MOREIRA et al., 1992; SOUZA et al., 1994). Entretanto, pouquíssimas estirpes foram caracterizadas geneticamente. Logo, as bactérias com capacidade de nodular leguminosas nativas são ainda pouco conhecidas no país (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Isso salienta ainda mais a importância de estudar e caracterizar as estirpes nativas.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado a nodulação em espécies de leguminosas do gênero *Mimosa* com estirpes de *Burkholderia* (VANDAMME et al., 2002; BARRETT e PARKER, 2005; CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2006; ARAÚJO, 2014; MOURA et al., 2016; PRIMIERI et al., 2016). O presente trabalho corrobora com os demais trabalhos acerca da capacidade de nodulação e eficiência de *Burkholderia*.

Há também registros na literatura de nodulação do gênero *Mimosa* com os gêneros: *Bradyrhizobium* (OYAIZU et al., 1993; BARRETT e PARKER, 2005); *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997; BARRETT e PARKER, 2005); *Rhizobium* (OYAIZU et al., 1993; WANG et al., 1999; BARRETT e PARKER, 2005); *Ralstonia* (CHEN et al., 2001); *Cupriavidus* (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; PRIMIERI et al., 2016) e *Burkholderia* (PRIMIERI et al., 2016).

Com a espécie *M. bimucronata*, foram identificados os gêneros *Burkholderia* (CHEN et al., 2005; ARAÚJO, 2014; HERNÁNDEZ, et al., 2017; MOURA et al., 2016), *Rhizobium* e *Glucanobacter* (HERNÁNDEZ et al., 2017; MOURA et al., 2016).

O gênero *Paenibacillus* é geralmente endofítico de nódulos, e não nodulífero, todavia há relatos na literatura de nodulação em feijão-caupi por esse gênero (MARRA et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013; COSTA et al., 2013), em *Trifolium pratense* (LATIF et al., 2013), em siratro (*Macropitium atropurpureum*) (DE OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014; SILVA, 2015).

Costa (2014) isolou de nódulos de *M. bimucronata*, *Bacillus*, e posteriormente inoculou em siratro, onde comprovou a formação de

nódulos. *Bacillus*, também é uma bactéria comumente encontrada no interior de nódulos, e que pela primeira vez foi observada nodulando.

Segundo alguns autores, bactérias endofíticas de nódulos poderão evoluir por meio da transferência horizontal de genes simbióticos à bactérias simbióticas (TRINICK et al., 1989; SPRENT, 2003; LI et al., 2008; SHIRAISHI et al., 2010). Latif et al., (2013) verificaram nodulação em *Trifolium pratense* por *Paenibacillus*, e por meio da análise das sequências de nucleotídeos confirmaram a presença de genes *nod*.

Shiraishi et al. (2010) detectaram a ocorrência de nodulação em *Robinia pseudoacacia* por *Pseudomonas* sp. e a presença de genes simbióticos (*NodA*, *nifH* e *nifHD*) nesse gênero. Esses autores constataram, ainda, que o gene *NodA* apresentava alta relação genética entre estirpes de *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Burkholderia* sp. e *Mesorhizobium loti* isoladas do mesmo solo, o que indica uma possível ocorrência de transferência lateral de genes. Dessa forma, sugere-se estudos futuros a verificação da presença de genes *Nod* nos isolados R129, R149 e R158, o que contribuirá para determinar a origem da transferência de genes e um melhor entendimento da FBN e nodulação para esses isolados.

Em *S. tomentosa*, foram relatados casos de nodulação com os gêneros *Rhizobium* (SUTTON e PETERSON, 1980; FOSTER et al., 1998; STOEHELIN et al., 2006) e *Sinorhizobium* (HUNG et al., 2005). Inúmeros autores têm relatado a nodulação do gênero *Sophora* com espécies do gênero *Mesorhizobium* (CHEN et al., 1995; JARVIS et al., 1997; DE MEYER et al., 2016; ANDREWS e ANDREWS, 2016). Entretanto, esse é o primeiro registro de nodulação com *Bradyrhizobium* para o gênero *Shopora*.

Para o gênero *Dalbergia*, há relatos de nodulação com os gêneros da classe α -Protobacteria: *Bradyrhizobium* (FARIA, 1997; MOREIRA et al., 1993; MOREIRA et al., 1998; PARKER, 2004; RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; COSTA, 2014), *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005), *Rhizobium* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; GHOSH et al., 2005; LIN et al., 2009; COSTA, 2014). E com os gêneros da classe β -Protobacteria: *Burkholderia* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005; LU et al., 2012; COSTA, 2014; MOREIRA et al., 2016) e *Ralstonia* (RASOLOMAMPIANINA et al., 2005). Segundo Andrews e Andrews (2016), a tribo *Dalbergiae* nodulam primeiramente com *Bradyrhizobium*, mas são promiscuas em relação as espécies de *Bradyrhizobium*.

Já para a espécie *D. ecastophyllum*, são praticamente inexistentes os trabalhos que avaliaram ou identificaram a capacidade de nodular na espécie. Parker e Rousteau (2014), observaram associação com o gênero *Bradyrhizobium*, no entanto não testaram a eficiência simbiótica entre eles. Assim como no presente trabalho, houve compatibilidade entre o gênero *Bradyrhizobium* e *D. ecastophyllum*. Entretanto, é o primeiro registro na literatura da associação dessa espécie com o gênero *Burkholderia*.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Isolados de rizóbios autóctones de áreas de restinga beneficiam o crescimento de leguminosas nativas do PAERV com potencial de serem empregadas em programas de revegetação de áreas degradadas;
- ✓ Isolados de rizóbios eficientes para as leguminosas nativas do PAERV promovem incrementos no acúmulo de N na parte aérea das plantas e isso pode contribuir para o incremento desse nutriente em solos de áreas de restinga de baixa fertilidade;
- ✓ O isolado de rizóbio mais eficiente para *S. tomentosa* foi o R155, e para *M. bimucronata* o R141 e R158. E em *D. ecastophyllum*, nenhum dos isolados avaliados que foram compatíveis com a espécie apresentaram elevada eficiência simbiótica, no entanto os isolados que mais se destacaram em relação ao acúmulo de biomassa foram o R129, R141, R149 e R155;
- ✓ Por meio do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S, os isolados R129, R141, R149, R155 e R158 foram identificados como sendo pertencentes aos gêneros: *Burkholderia* (R141), *Bradyrhizobium* (R155) e *Paenibacillus* (R129, R149 e R158), respectivamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus* nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and environmental Microbiology**, v. 68, p. 4025-4034, 2002.

ANDREWS, M.; ANDREWS, M.E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **Preprints**, 2016.

ARAÚJO, D. S. D.; LACERDA, L. D. A Natureza da Restinga. **Ciência hoje**, p. 42-48, 1987.

ARAÚJO, D. S. D. Restingas: síntese dos conhecimentos para a costa sul-sudeste brasileira. São Paulo: Aciesp, 1987. 347 p.

ARAÚJO, D. S. D.; HENRIQUES, R. P. B. Análise florística das restingas do estado do Rio de Janeiro. Ubatuba: Instituto Pau Brasil de História Natural, 2007. 97p.

ARAÚJO, K. S. **Eficiência simbiótica e identificação de estirpes de *Burkholderia* oriundas de campos rupestres**. 2014. 129f. Dissertação (Mestrado) – UFLA, Lavras. 2014.

ARAÚJO, K. S.; CARVALHO, F. de; MOREIRA, F. M. S. *Burkholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropitilium atropurpureum*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2017.

ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J.; THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, Guarapari. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 349–361, 2004.

ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Estrutura e Composição florística de quatro formações vegetais no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, EJ, Brasil. **Acta Botânica**, v. 14, n. 3, p. 301-315, 2000.

ATKINS, C. A. Efficiencies and inefficiencies in the legume/ Rhizobium symbiosis - a review. **Plant and Soil**, v. 82, p. 273-284, 1984.

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.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.

BARROS, F. de.; MELO, M. M.R.F. de; CHIEA, S.A.C.; KIRIZAWA, M.; WANDERLEY, M. das G.L.; JUNG-MENDAÇOU, S.L. 1991. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso: caracterização geral da vegetação e listagem de espécies ocorrentes. São Paulo. v. 1. 84p.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, G. C.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 2337, 1984.

BECHARA, F. C. **Restauração ecológica de restingas contaminadas por Pinus no Parque Florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC**. 2003. Dissertação (Mestrado) - UFSC, Florianópolis. 2003.

BECHARA, F. C.; REIS, A.; TRENTIN, B. E. Invasão biológica de *Pinus elliottii* Var. *elliottii* no Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. **Floresta**, v. 44, n. 1, p. 63-72, 2013.

BERENHAUSER, H. **Afforestation of coastal swamps and dunes at Rio Vermelho**. Floresta 2, Ano IV. Universidade Federal do Paraná, p.13-17, 1973.

BITENCOURT, F.; ZOCHE, J. J.; COSTA, S.; SOUZA, P. Z.; MENDES, A. R. Nucleação de *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze em áreas degradadas pela mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 5, p. 750-752, 2007.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial, p. 540, 1960.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução n.º 004**, de 18 de setembro de 1985.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução CONAMA n. 2**, de 18 de março de 1994.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução CONAMA 261/99**, de 30 de junho de 1999.

BRASIL1. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução do CONAMA n. 303**, de 20 de março de 2002.

BRASIL2. **Impactos sobre a biodiversidade**, 2002. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiv/perda.html>> Brasília. Acesso em 22 de março de 2015.

BRITO, V. L. G.; PINHEIRO, M.; SAZIMA, M. *Sophora tomentosa* e *Crotalaria vitellina* (Fabaceae): biologia reprodutiva e interações com abelhas na restinga de Ubatuba, São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 185, 2010.

CAMARGO, R. A. **A tribo Dalbergieae (Leguminosae - Faboideae) no estado de Santa Catarina, Brasil**. 2005. 153f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

CANEI, A. D. **Avaliação da diversidade de rizóbios de áreas de restinga da Unidade de Conservação Ambiental do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - UFSC, Florianópolis, SC. 2014.

CANOSA, G. A.; FARIA, S. M.; MORAES, L. F. D. Leguminosas florestais da Mata Atlântica brasileira fixadoras de nitrogênio atmosférico. **Circular Técnica, EMBRAPA**, Seropédica, RJ, 2012.

CARUSO, M. M. L. O desmatamento da Ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais. **Editora UFSC**, Florianópolis, p.158, 1983.

CARVALHO, A. M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, p. 87-109, 1997.

CARVALHO, P. E. R. Maricá – *Mimosa bimucronata*. **Circular Técnica, EMBRAPA**, PR, p. 8, 2004.

CECCA - Centro de Estudos de Cultura e Cidadania. Unidades de conservação e áreas protegidas da Ilha de Santa Catarina: caracterização e legislação. **Insular**. Florianópolis, p. 11-85, 1997.

CHAGAS-JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. O. Produção de ácido indol acético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, v. 56, p. 812-17, 2009.

CHAPIN, F. S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 233-260, 1980.

CHAVES, R. Q.; CORRÊA, G. F. Macronutrientes no sistema solo-*Pinus caribaea* Morelet em plantios apresentando amarelecimento das acículas e morte de plantas. **Revista Árvore**. Viçosa, v. 29, n. 5, 2005.

CHEN, W.; YAN, G.; LI, J. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 392-397, 1988.

CHEN, W.; WANG, S.; LI, Y.; Characteristics of *Rhizobium tianchanense* sp. Nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International of Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 153-159, 1995.

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

CHEN, W. M.; FARIA, S. M. D. E.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARÚJO, J. L.; CHOU, L.; CHOU, Y.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, 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**, n. 71, p. 7461-7471, 2005.

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

CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHIMMEL, D. S.; FISHER, H.; HOWARTH, R. W.; HEDIN, L. O.; ... WASSON, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global biogeochemical cycles*, v. 13, n. 2, p. 623-645, 1999.

COELHO, K. P. **Simbioses de rizóbios com leguminosas arbóreas na pré-amazônia maranhense**. 2016. Tese (Doutorado) – UFPA, Belém. 2016.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

COSTA, J. S. **Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro**. 2014. Dissertação (Mestrado) – UFPA, Belém. 2014.

DELGADILLO, L. A. E.; GONZÁLEZ, R. C. A.; PRIETO, G. F.; VILLAGÓMEZ, I. J. R.; ACEVEDO, S. O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación Tropical y Subtropical. **Agroecosystems**, v.14 p.597-612, 2011.

DE MEYER, S. E., TAN, H. W., ANDREWS, M., HEENAN, P. B., WILLEMS, A. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowharii* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 2, p. 786-795, 2016.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; SOARES, B. L.; BOMFETI, C. A., DA SILVA, K.; FERREIRA, P. A. A., MOREIRA, F. M. S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.

D'EON, R. G. D.; GLENN, S. M.; PARFITT, I.; FORTIN, M. J. Landscape connectivity as a function of scale and organism vagility in a real forested landscape. **Conservation Ecology**, v.6, n.2, p. 10, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUHAMEL, M. S. D.; WEHR, L. Y.; HOMA, R.; SEEPERSAD, D.; DWORATZEK, S.; COX, E. E.; EDWARDS, E. A. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. *Water Research*, **Oxford**, v. 36, p. 4193-4202, 2002.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., A stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rosata*. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

EHRHARDT-BROCARDI, N. C. M.; STOCCO, P., TRAMONTIN, A. L.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SANTOS, J. C. P. Cultural, morphological and genetic diversity of diazotrophs isolated from nodules of bracinga. **Revista Árvore**, v. 39, n. 5, p. 923-933, 2015.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (Curitiba-PR). Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, p. 113, 1988.

FARIA, S. M.; LEWIS, G. P.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, v.111, p. 607-619, 1989.

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

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. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas, Lavras, p. 667-686, 1999.

FARIA, S. M. de; CAMPELO, E. F. C. Algumas espécies de leguminosas fixadoras de nitrogênio recomendadas para vegetação de áreas degradadas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, p. 8, 2000.

FARIA, S. M.; UCHÔAS, E. S. **Indicação de estirpes de Rizóbios eficientes na fixação biológica do nitrogênio para espécies de uso múltiplo, atualização ano base 2006**. Seropédica, RJ, 2007.

FATMA – Fundação Amparo Tecnologia e Meio Ambiente. **Parque Estadual do Rio Vermelho**. Disponível em: <<http://www.fatma.sc.gov.br/conteudo/parque-estadual-do-rio-vermelho>>. Acesso em 10 de maio de 2015.

FERREIRA, F. A. C.; NEVES, B.; MEDEIROS, J. D.; TESTA, G.; MACHADO, D. A.; D'ALASCIO, S. Z.; GHIZONI, I. R.; OLIVEIRA, C. P. L. P.; PAIVA, J.; PHILLIPPI, L.S.; VAZ, N. P. **O planejamento e a gestão a gestão ambiental em Unidades de Conservação (UCs): O caso do Parque Estadual do Rio Vermelho**, UFSC, 2009.

FERREIRA, P. A.; BOMFETI, C. A.; da SILVA JÚNIOR, R.; SOARES, B. L.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2012.

FERREIRA, P. A. A.; LOPES, G.; BOMFETI, C. A.; OLIVEIRA LONGATTI, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; GUILHERME, L. R. G.; MOREIRA, F. M. S. Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2055-2066, 2013.

FERNANDES, A. A. Fitogeografia brasileira. Fortaleza: **Multigraf**, p. 340, 1998.

FOSTER, C. M.; HORNER, H. T.; GRAVES, W. R. Nodulation response of woody Papilionoid species after inoculation with rhizobia and soil from Hawaii, Asia and North America. **Plant and Soil**, v. 205, n. 2, p. 103-111, 1998.

FRANCO, A. A.; DAY, J. M. Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. **Turrialba**, v. 30, p. 99-105, 1980.

FRANCO, A. A. Revegetação de solos degradados. **In: Workshop sobre recuperação de áreas degradadas**, Anais, I, UFRRJ, Itaguaí, p. 133-157, 1991.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. **In: Simpósio sobre Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas**, UFRRJ, Itaguaí, p.13, 1992.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. D. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 9, p. 1856-1861, 2011.

GARSABALL, J. A. L.; CUEVAS, M. C. S. Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "Querepa Rosada" con hipoclorito de sodio. **Revista UDO Agrícola**, v.6, n.2, p. 60-66, 2006.

GASSEN, D. N.; GASSEN, F. R. Plantio direto. Passo Fundo, Aldeia Sul, p. 207, 1996.

GHOSH, A. C.; GHOSH, S.; BASU, P. S. Production of extracellular polysaccharide by a *Rhizobium* species from root nodules of the leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. **Engineering in life sciences**, v. 5, n. 4, p. 378-382, 2005.

GLICK, Bernard R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 475-484, 1992.

GUIMARÃES, T. B. **Florística e fenologia reprodutiva de plantas vasculares na restinga do Parque Municipal das Dunas da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC.** 2006. 107f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

GUIMARÃES, S. L., CARDINAL, M. S., BOMFIM-SILVA, E. M., POLIZEL, A. C. Development of cv. BRS Novaera cowpea inoculated with rhizobium recommended for pigeonpea. **Científica**, v. 43, n. 2, p. 149-155, 2015.

HERNÁNDEZ, A. G.; de MOURA, G. D.; BINATI, R. L.; NASCIMENTO, F. X. I.; LONDOÑO, D. M.; MAMEDE, A. C. P.; ... SOARES, C. R. F. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of Microbiology**, p. 1-11, 2017.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: **California Agriculture Experiment Station**, p. 32, 1950.

HOLANDA, P. C. Conservação dos ecossistemas litorâneos. In: **“Workshop” Nacional de educação para o meio ambiente.** Ceará, 1988.

HORN FILHO, N. O. Estágios de Desenvolvimento Costeiro no Litoral da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **Revista Discente Expressões Geográficas**: Programa de Pós-Graduação em Geografia. UFSC, p.71-77, 2006.

HUNG, M. H.; BHAGWATH, A. A.; SHEN, F. T.; DEVASYA, R. P.; YOUNG, C. C. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 577-584, 2005.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **Fixação Biológica de Nitrogênio na Soja**. Embrapa, p. 11-15, 2001.

HAY, J. D.; LACERDA, L. D. Ciclagem de nutrientes no ecossistema de restinga. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 1984. 475p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Manuais Técnicos em Geociências, São Paulo, n.1, p.92, 1992.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Flora das restingas do litoral norte da Bahia costa dos coqueiros e salvador**. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Projeto Flora/Fauna - Ue/Ba - Herbário Radambrasil. Salvador, BA, 2004.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v.70, p.397-404, 2013.

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 loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to a new genus: *Mesorhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 47, p. 895-898, 1997.

JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule

Bacteria from Leguminous Plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

JORDAN, D. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. **In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Edited by J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256, 1984.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of anaerobic facultatively methylotrophic, legume root-nodulatinf-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

JOUYBAN, Z. Ethylene biosynthesis. **Technical Journal Engineering Applied Sciences**, v. 1, p. 107-100, 2012.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. **Artmed**, Porto Alegre, 2009.

KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 41-42, p. 83-93, 1989.

KIM, Y.; SHIN, D. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. **Food Microbiology**, v. 22, p. 37-45, 2005.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI-JUNIOR, R. Colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface. **Nucleus**, v. 11, n. 2, p. 443-452, 2014.

KUDOYAROVA, G. R.; FARKHUTDINOV, R. G.; VESELOV, S. Yu. Comparison of the effects of nitrate and ammonium forms of nitrogen on auxin content in roots and the growth of plants under different temperature conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 23, n. 3, p. 207-208, 1997.

KUMAR, A.; DASH, D.; JHARIYA, M. K. Impact of *Rhizobium* on growth, biomass accumulation and nodulation in *Dalbergia sissoo* seedlings. **The Bioscan**, v. 8, n. 2, p. 553-560, 2013.

LAMMEL, D. R., CRUZ, L. M., MESCOLOTTI, D., STÜRMER, S. L., CARDOSO, E. J. Woody Mimosa species are nodulated by *Burkholderia* in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Plant and soil**, v. 393, n. 1-2, p.123-135, 2015.

LASTE, K. C. D.; GONÇALVES, F.S.; FARIA, S. M. Estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 8p. (Embrapa CNPAB. Comunicado Técnico, 115).

LATIF, S.; KHAN, S.; NAVEED, M.; MUSTAFA, G.; BASHIR, T.; MUMTAZ, A. S. The diversity of *Rhizobia*, *Sinorhizobia* and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. **Archives of microbiology**, v. 195, n. 9, p. 647-653, 2013.

LEÃO, Z. M. A. N.; DOMINGUEZ, J. L. M. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 112-126, 2000.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**, Kew p. 369, 1987.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 2005.

LIN, D. X.; CHEN, W. F.; WANG, F. Q.; HU, D.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59 n. 8, p. 1919-1923, 2009.

LI, J. H.; 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 and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 1. 3ª ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p.352, 2000.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, v.1, 2002.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

MALAVOLTA, E. Os elementos minerais. In: Elementos de Nutrição mineral de Plantas. Ed.: **Agrônômica Ceres**. São Paulo, 1980.

MANTELIN, S.; FISCHER-LE S. M.; ZAKHIA, F.; BÉNA G.; BONNEAU, S.; JEDER H., DE LAJUDIE, P.; CLEYET-MAREL, J. C. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 827-839, 2006.

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

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

MEDEIROS, J. D. Fruit description and preliminary analysis on reproductive phenological data of *Mimosa catharinensis* Burkart (Leguminosae-Mimosoideae). **Journal La Pensée**, Paris, v. 76, p. 113, 2014.

MMA- Ministério do Meio Ambiente. Projeto Parque Estadual do Rio Vermelho: Subsídios ao plano de manejo. Florianópolis, 2009.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Quarto Relatório Nacional para a Convenção da Diversidade Biológica**. Brasília, 2011.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Bioma: **Mata Atlântica**, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 10 de abril de 2015.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Unidades de Conservação**, Brasília, 2015. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao>>. Acesso em: 20 de agosto de 2015.

MORAES, L. K. A.; SILVEIRA, C. J. G.; da SILVA, C. V.; LOCATELLI, L.; ROGALSKI, J. M.; SANTOS, E. R. D.; MARTINS, M.; GAIO, M. F.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. Diversidade Genética em *Mimosa catharinensis*, uma espécie endêmica do Parque Florestal do Rio Vermelho na ilha de Santa Catarina. **In: 50º Congresso Brasileiro de Genética**. Florianópolis, 2004.

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**. 1991. 152 f. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Brasil. 1991.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M. F.; FARIA, S. M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon Region of Brazil. **New Phytologist**, v. 121, p. 563-570, 1992.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2.ed. Lavras: UFLA. 81 p, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA: Lavras, p. 621-666, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; COELHO, K. P.; RIBEIRO, P. R. D. A.; GUIMARÃES, A. A. Nursery growth and rhizobia symbiosis of scandent Leguminosae species native to the Amazon region. **Acta Amazonica**, v. 46, n.4, 367-376, 2016.

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

MOURA, G. G. D. D.; ARMAS, R. D. D.; MEYER, E.; GIACHINI, A. J.; ROSSI, M. J.; SOARES, C. R. F. S. Rhizobia Isolated from Coal Mining Areas in the Nodulation and Growth of Leguminous Trees. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 2016.

MUNIZ, A. W.; WORDELL, J. A. F.; SACCOL, E. L. S. Promoção de crescimento vegetal por rizóbios. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 25, n.3, 2012.

NASCIMENTO, C. W. A.; BIONDI, C. M. Fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (ORGS.). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guia novos Agrolivros**, p. 463-486, 2008.

NETO, C. D. Composição florística de três trechos de restinga arbórea contaminada por *Pinus* sp., no Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. 2009. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – UFSC, Florianópolis. 2009.

NEVES FILHO, S. **Caracterização funcional das tipologias vegetacionais da Barra da Tijuca e suas implicações no estabelecimento das compensações ambientais**. 2009. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - UFRRJ, Seropédica. 2009

NOGUEIRA, E. M. L. **Ecologia reprodutiva de *Sophora tomentosa* L. (Leguminosae) em restinga da Praia da Joaquina, Florianópolis, SC.** 2003. Dissertação (Mestrado) - UFSC, Brasil. 2003.

NOGUEIRA, E. M. L.; ARRUDA, V. L. V. Fenologia reprodutiva, polinização e sistema reprodutivo de *Sophora tomentosa* L. (Leguminosae - Papilionoideae) em restinga da praia da Joaquina, Florianópolis, Sul do Brasil. **Biotemas** (UFSC), v. 19, p. 29-36, 2006.

OGAN, M. T. The nodulation and nitrogenase activity of natural stands of mangrove legumes in a Nigerian swamp. **Plant and soil**, v. 123, n. 1, p. 125-129, 1990.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1999.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosieae*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p.85-97, 2001.

OLIVEIRA, J. C.; MAIA, V. C. **Ocorrência e caracterização de galhas de insetos na restinga de Grumari, RJ.** Arquivos do Museu Nacional/UFRJ, v.63, n.4, p.669-675, 2005.

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.

PARKER, M. A. rRNA and dnaK relationships of *Bradyrhizobium* sp. nodule bacteria from four papilionoid legume trees in Costa Rica. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 3, p. 334, 2004.

PARKER, M. A.; ROUSTEAU, A. Mosaic origins of *Bradyrhizobium* legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 77, p. 110-115, 2014.

PASCUAL, J. O. Cuatro décadas en la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Discurso leído en el acto de su recepción como académico numerario. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-químicas y Naturales de Granada, 2003.

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 650-659, 2008.

PATREZE, C. M.; COREDEIRO, L. Inoculation of *Lonchocarpus muehlbergianus* and *Platypodium elegans* with rhizobia and/or mycorrhizal fungi. **Acta Botanica Brasilica**, 2005.

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

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; MIYUKI, I.; OTSUBO, N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 33, n. 1, p. 219-226, 2009.

PINHEIRO, M.; SAZIMA, M. Visitantes florais e polinizadores de seis espécies arbóreas de Leguminosae melitófilas na Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira Biociências**. v. 5, n.1, p. 447-449, 2007.

PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2075-2079, 2014.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

PRIMIERI, S.; DALLA COSTA, M.; STROSCHEIN, M. R. D.; STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; ANTUNES, P. M. (2016). Variability in symbiotic effectiveness of N₂ fixing bacteria in *Mimosa scabrella*. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 19-25, 2016.

RADAMBRASIL. **Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra** - Projeto RADAMBRASIL, MME, Rio de Janeiro, p. 786, 1983.

RASOLOMAMPIANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; BÉNA, G.; RAMAROSON, L.; AVARRE, J. C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to madagascar host seven different genera belonging to α - and β -proteobacteria. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 4135-4146, 2005.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

REDMOND, J.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M.; INNES, R.; KUEMPEL, P.; ROLFE, B. Flavones Induce Expression of Nodulation Genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632–635, 1986.

REITZ, R. A vegetação da zona marítima de Santa Catarina. **Sellowia**, v. 13, p. 17-115, 1961.

REITZ, R. Aristoloquiáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí, p.35-39, 1975.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. **Sellowia**, v.34-35, p.1-525, 1983.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio Grandense de Artes Gráficas, 1988.

RICKLEFS, R. E. **Economia da natureza**. 6 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p.349–366, 2010.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBARAO, N.; METEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. D.;

MARTINEZMOLINA, E.; A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5217-5222, 2002.

RODRIGUES, G. R. G. **Análise do crescimento de espécies vegetais utilizadas na restauração de áreas de restinga: resposta da adição de fungos micorrízicos arbusculares e nitrogênio**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Florestas, Departamento de Ciências Ambientais, UFRRJ, Seropédica. 2008.

RODRIGUES, G. R. G.; GOI, S. R.; SOUZA, F. R.; ZAMITH, L. R. Parâmetros morfológicos utilizados na avaliação da qualidade de mudas *Clusia fluminensis* Planch & Triana em resposta à aplicação de diferentes fontes de nitrogênio. XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal/SBFV. Fortaleza, CE, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Piracicaba, 1979.

SAUR, E.; CARCELLE, S.; GUEZENNEC, S.; ROUSTEAU, A. Nodulation of legume species in wetlands of Guadeloupe (Lesser Antilles). **Wetlands**, v. 20, n. 4, p. 730-734, 2000.

SCHIAVO, J. A. **Revegetação de áreas degradadas pela extração de argila, com espécies micorrizadas de *Acacia mangium*, *Sesbania virgata* e *Eucalyptus camaldulensis***. 2005. Tese (Doutorado) - UENF, Brasil. 2005.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; ... STUMPF, R. Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

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

SILVA, S. M. Diagnóstico das restingas no Brasil. In: **Fundação BIO RIO, Workshop Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade na Zona Costeira e Marinha. Porto Seguro, Anais Eletrônicos**, p. 2008, 1999. <http://www.bdt.org.br/workshop/costa/Restinga>. Acesso em 07 de maio de 2016.

SILVA, S. M.; BRITZ, R. M. A vegetação da planície costeira. In MARQUES, M. C. M.; BRITZ, R. M. **História Natural e Conservação da Ilha do Mel**. Curitiba, Editora da Universidade Federal do Paraná, p. 49-84, 2005.

SILVA, E. D.; TOZZI, A. M. G. A. Leguminosae na Floresta Ombrófila Densa do Núcleo Picinguaba, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica** (Edição em português. Impresso), v.11, p. 4, 2011.

SILVA, J. S. **Simbioses de rizóbio com nove espécies de leguminosas florestais em viveiro do Quadrilátero Ferrífero**. 2015. Dissertação (Mestrado) – UFLA, Lavras. 2015.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O.(Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo - Ecossistemas tropicais e sub-tropicais**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole Editora Ltda, v. 1, p. 495-524, 2008.

SOUZA, L. A. G.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W. Capacity of nodulation of 100 Leguminosae in Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 24, p. 9-18, 1994.

SOUZA, V. C.; CAPELLARI Jr, L. A vegetação das dunas e restingas da estação ecológica Juréia-Itatins, pp. 103-114. **Em: Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna** (O.A.V. Marques & W. Duleba, eds.). Holos, Ribeirão Preto, 2004.

SOUZA, C. R. de G.; LOPES, E. A.; MOREIRA, M. G. Proposta de classificação de biomas de planície costeira e baixa-média encosta em Bertioxa (SP). **In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007.

SOUZA, C. R. G. "**Restinga**" **Conceitos e Empregos do Termo no Brasil e Implicações na Legislação Ambiental**. São Paulo: Instituto Geológico, p. 104, 2008.

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

SPRENT, Janet. Plant biology: Mutual sanctions. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 672-674, 2003.

STAEHELIN, C., FORSBERG, L. S., D'HAENZE, W., GAO, M. Y., CARLSON, R. W., XIE, Z. P., ... BROUGHTON, W. J. Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n.17, p. 6168-6178, 2006.

STUART, J. **Leguminosas fixadoras de nitrogênio facilitam outras espécies arbóreas em uma floresta de restinga?** 2010. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. 2010.

STURGESS, P. W. **Post-felling vegetation changes on three afforested sand-dune systems**. 1991. 244 f. Thesis (PhD) - University of Liverpool, UK. 1991.

SUGIYAMA, M. **Estudo de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil**. Bol. Inst. Bot., São Paulo, n. 11, p. 119-159, 1998.

SUGUIO, K.; TESSLER, M. G. **Planícies de cordões litorâneos do Brasil: origem e nomenclatura**. In: Lacerda, L. D. de et al. (orgs.).

Restingas: origem estruturas e processos. Niterói, CEUFF. p. 195-216, 1984.

SUGUIO, K.; MARTIN, L. **Classificação de costas e evolução geológica das planícies litorâneas quaternárias do sudeste e sul do Brasil.** In: ACIESP (org.). Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. Anais, v. 1. p. 1-28, 1987.

SUGUIO, K.; MARTIN, L. **Geomorfologia das Restingas.** In: **II Simpósio de Ecossistema da Costa Sul e Sudeste Brasileiro: Estrutura, função e manejo.** Águas de Lindóia, ACIESP (org.), 1987, v.3, p.185-205, 1990.

SUTTON, W. D.; PATERSON, A. D. Effects of the plant host on the detergent sensitivity and viability of *Rhizobium* bacteroids. **Planta**, v. 148, n. 3, p. 287-292, 1980.

TAN, H. W. **Characterisation of rhizobia associated with New Zealand native legumes (Fabaceae) and a study of nitrogen assimilation in *Sophora microphylla*.** 2014. Tese (Doutorado) – Lincoln University, New Zealand. 2014.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BPHEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. *Boletim técnico*, 5.

TEYSSIER, C.; JUMAS-BILAK, E. ***Ochrobactrum* in molecular detection of bacterial pathogens.** Edited by Dongyou Liu. Taylor's and Fancis. 2010.

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**, v. 55, n. 8, p. 2046-2055, 1989.

TURK, D.; KEYSER, H. H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of microbiology**, v. 38, n. 6, p. 451-460, 1992.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA A.; IGUA, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.63, p. 2344-2350, 2003.

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

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**, n. 25, p. 507-512, 2002.

VILLWOCK, J. A. A. Costa Brasileira: geologia e evolução. **In: ACIESP. 3º Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Brasileira**. Anais v.1, p. 1-15, 1994.

VINCENT, J. M. A. Manual for the Practical Study of root-nodule bacteria. Oxford: **Blackwell Scientific**, (International biological programme handbook, 15), p. 164, 1970.

VITALI, M.; UHLIG, V. M. Unidades de Conservação de Santa Catarina. Sustentabilidade em debate. **Periódico da Universidade de Brasília**, p. 44-61, 2010.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2nd edition. John Wiley & sons, Inc., New York, 1995.

WAECHTER, J. L. Comunidades vegetais das restingas do Rio Grande do Sul. **In: ACIESP (org.). 2º Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira**. Anais v. 3, p. 228-248, 1990.

WANG, E. T.; ROGEL-HERNÁNDEZ, A.; SANTOS, A. G.; MARTINEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. Mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 49, p. 1479-1491, 1999.

XI, C.; SCHOETERS, E.; VAN DER LEYDEN, J.; MICHELS, J. Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* casA encoding a secreted calmodulin-related protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p. 11114 – 11119, 2000.

YAO, P.; VINCENT, J. Host Specificity in the Root Hair "Curling Factor" of *Rhizobium sp.* **Australian Journal of Biological Sciences**, v.22, p.413-423, 1969.