

Diversidade de Rizóbios que Nodulam Bracatinga Isolado de Solos Cultivados e de Floresta

Diversity of Rhizobia Nodulating Bracatinga from Cultivated Soils and Forest

Diogo Fernando Saturno^{*a}; Diva Souza Andrade^b

^aUniversidade Estadual de Londrina. Curso de Ciências Biológicas. PR, Brasil.

^bInstituto Agronômico do Paraná, Laboratório de Microbiologia do Solo. PR, Brasil.

*E-mail: diogosaturno@gmail.com

Resumo

A *Mimosa scabrella*, conhecida como bracatinga, é uma espécie florestal nativa do sul do Brasil que possui elevada taxa de crescimento e é utilizada na recuperação de áreas degradadas. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a presença de bactérias que nodulam a bracatinga em solos com diferentes históricos de uso, isolar e avaliar as características morfo-fisiológicas e genéticas dessas bactérias. Amostras de solos de áreas sob cultivos de milho, soja, pupunha, e sob floresta foram coletadas em 35 municípios do Estado do Paraná. As amostras foram cultivadas com bracatinga. De cada planta, três nódulos foram escolhidos aleatoriamente, desinfestados à superfície e macerados. A suspensão obtida foi riscada em meio de cultura específico para isolamento e posterior caracterização morfofisiológica, tomando-se como referência a estirpe de *Rhizobium* sp. (SEMIA 6165, FEPAGRO). Das amostras de solo, 70% apresentaram rizóbios capazes de nodular a bracatinga. As características morfológicas predominantes foram: tamanho > 2 mm, forma circular, textura úmida, produção de goma, absorção de corante, colônias elevadas, com bordas e superfícies lisas e opacas. Quanto ao pH, 61% acidificaram o meio e nenhum isolado produziu melanina. As estirpes isoladas de bracatinga apresentaram diversidade sem relação com o histórico da área de origem.

Palavras-chave: DNA. *Mimosa*. *Rhizobium*.

Abstract

Mimosa scabrella known as bracatinga, is a native forest species in southern Brazil that has a high growth rate and is used in land reclamation. The objectives of this study were: a) assess the presence of bacteria that nodulate the bracatinga in soils with different histories of use, b) to isolate and evaluate the morphological, physiological, and genetic traits of these bacteria. Soil samples from corn, soybeans, palm heart crops, and under forest fragments were collected in 35 municipalities of Paraná State, totaling 188 samples. Each sample was cultured with bracatinga. From each plant, three nodules were randomly chosen, disinfected and mashed. The suspension was scratched in specific culture medium for isolation and further morphologic characterization, using *Rhizobium* sp. strain as a reference (SEMIA 6165, FEPAGRO). Of the soil samples, 70% had rhizobia capable of nodulating bracatinga. The morphological manifestations were: size between 2 mm to 4 mm, circular shape, wet texture, gum production, dye absorption, high colonies, with smooth and opaque edges and surfaces. For pH, 61% soured the environment and produced no melanin, as well as the reference strain. The strains isolated from bracatinga showed diversity without regard to the history of the area of origin.

Keywords: DNA. *Mimosa*. *Rhizobium*.

1 Introdução

A *Mimosa scabrella* conhecida popularmente como bracatinga, é uma espécie florestal nativa do Sul do Brasil¹. Possui elevada taxa de crescimento e considerada uma das mais rápidas entre as árvores brasileiras (LORENZI, 1992; BAGGIO, 1994). Por ser uma espécie facilitadora, é recomendada para recuperação de áreas com solos degradados, pois as árvores recobrem o solo em poucos meses e minimizam os efeitos do intemperismo, impedindo os processos de lixiviação e erosão, além de incorporar elevados teores de nitrogênio e fósforo (MARCHIORI, 1997).

A espécie apresenta associação com grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio, popularmente conhecidas como rizóbios (GAIAD; CARPANEZZI, 1984). Esta associação entre plantas leguminosas e bactérias é uma simbiose

biológica, cujos benefícios são reconhecidos através da técnica da Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN (XAVIER *et al.*, 2006). A FBN ocorre em estruturas específicas que se formam nas raízes das plantas, denominadas nódulos, que são formados após a adesão das células do rizóbio à raiz da planta, iniciando-se uma infecção radicular, cujo processo é conhecido como nodulação (HUNGRIA; VARGAS; ARAÚJO, 1997). No interior do nódulo, ocorre a fixação do nitrogênio atmosférico, o qual é convertido em formas assimiláveis pela planta.

Em áreas com solos degradados e que apresentam baixa disponibilidade de nitrogênio, as bactérias, associadas às plantas, exercem funções fundamentais na nutrição e no estabelecimento das espécies, acelerando a resiliência das áreas degradadas (HUNGRIA; VARGAS; ARAÚJO, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2008)). A FBN em espécies arbóreas

nativas é uma alternativa viável do ponto de vista econômico e ambiental. Portanto, estratégias que avaliem a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio no solo em que se pretende introduzir a planta de interesse são de grande importância (PELEGRIN *et al.*, 2009; KANEKO *et al.*, 2010).

Verifica-se que a capacidade de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas arbóreas nativas, visando à restauração de áreas com solos degradados, é um campo aberto para estudos e apresenta a possibilidade de que novas simbioses possam ser descobertas.

O conhecimento das espécies, sua amplitude geográfica, suas propriedades morfofisiológicas e genéticas, além da sua capacidade de interação com a planta é fundamental para fazer recomendações e avaliações precisas de bactérias para utilização em associação com plantas (STRALIOTTO; RUMJANECJ, 1999). É evidente que o avanço das técnicas de biologia molecular através dos processos de identificação tem permitido diagnosticar a diversidade bacteriana aliada às espécies vegetais (CHUEIRE *et al.*, 2003). Portanto, a avaliação da diversidade pode selecionar bactérias com capacidade de estabelecer simbiose com as leguminosas arbóreas nativas. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em solos cultivados e sob floresta de 35 municípios do Estado do Paraná, isolar e caracterizar morfofisiologicamente estes microrganismos, e formar um banco de estirpes com capacidade de nodular a bracatinga.

2 Material e Métodos

As amostras de solo foram coletadas em 35 municípios do Estado da Paraná, provenientes de áreas cultivadas (milho, soja e pupunha) e sob fragmentos florestais, acondicionadas em sacos plásticos e identificadas. Após a coleta, foram passadas por peneiras de 4 mm e realizadas análises químicas no laboratório de solos do IAPAR (dados não mostrado). Para obtenção do isolamento de rizóbios, a partir das amostras de solo, sementes de bracatinga (obtidas do banco de germoplasma de espécies florestais do IAPAR), utilizadas como planta isca, tiveram sua dormência quebrada em água a 80 °C e resfriadas à temperatura ambiente por 5 h. E, foram colocadas para germinar em vasos contendo as amostras de solo, com 4 sementes cada, deixando-se somente 2 plântulas/vaso, as quais foram cultivadas sob condições controladas de casa de vegetação no Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, Londrina/PR. Irrigação diária foi realizada para manutenção da umidade necessária ao crescimento das plantas.

A coleta ocorreu 130 dias após emergência. As plantas foram separadas em parte aérea e raiz. As raízes foram lavadas e os nódulos destacados do sistema radicular foram desinfestados superficialmente por imersão em etanol (70%) por 30 s, hipoclorito de sódio (5%) por 1 min e lavados 7 vezes consecutivas em água destilada esterilizada. Após a última lavagem, foi macerado com pinça esterilizada sobre

placas de Petri com meio extrato de levedura manitol sólido (LM) com vermelho congo (LMV), segundo metodologia descrita (VINCENT, 1970).

As colônias obtidas foram isoladas e purificadas por inoculação em placas com LVM até a obtenção de colônias homogêneas e com características persistentes. Os isolados foram mantidos em criopreservação a -80 °C com glicerol 65% e armazenados por liofilização na coleção de microrganismos fixadores de nitrogênio no Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico do Paraná.

As características fenotípicas estudadas foram as morfológicas e fisiológicas. As características morfológicas avaliadas para os isolados selecionados aleatoriamente e a estirpe referência foram: tempo de crescimento, tamanho, forma, elevação, bordas, superfície, textura, absorção de corante e produção de goma, através do crescimento em placas com LVM, seguindo as metodologias descritas em Vincent (1970) e Araújo (1994).

Quanto às fisiológicas, foram realizadas análises de modificação do pH do meio e produção de melanina. Para a análise de modificação do pH do meio, foi utilizado o meio cultura ELMA, contendo azul de bromotimol (0,25%), e as avaliações foram realizadas diariamente durante o período de 8 dias. A modificação do pH foi verificada através da coloração adquirida, azul (alcalino), amarela (ácido) e verde (neutro) (ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002).

Para a análise de produção de melanina, foi utilizado o meio TYA com pH 6,8 (VINCENT, 1970). A produção de melanina dos isolados foi avaliada conforme metodologia descrita em Cubo *et al.*, (1988). Colônias que não apresentam pigmentação não produzem melanina, enquanto que as colônias que apresentam coloração marrom ou preta são produtoras de melanina (ANDRADE *et al.*, 2002).

Os dados fenotípicos obtidos dos isolados e da estirpe referência foram transformados em um código binário, de 0 e 1, submetidos à análise de agrupamento de similaridade e as diferenças foram estimadas pela distância euclidiana com a opção UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean). Um total de 11 parâmetros foi considerado, sendo nove para características morfológicas e dois para as fisiológicas. Para as características morfológicas, foram determinados os seguintes parâmetros: tempo de crescimento (≤ 3 dias, 0; > 3 dias, 1); tamanho (≤ 2 mm, 0; > 2 mm, 1); forma (circular, 0; irregular, 1); elevação (elevada, 0; plana, 1); borda (lisa, 0; granulosa, 1); textura (viscosa, 0; seca, 1); absorção de corante (absorve, 0; não absorve, 1); produção de goma (produz, 0; não produz, 1); superfície (lisa, 0; granulosa, 1). Os resultados foram representados graficamente através de um dendrograma construído a partir do programa NTSYSpc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System) (SLICE; KIM; WALKER, 1994).

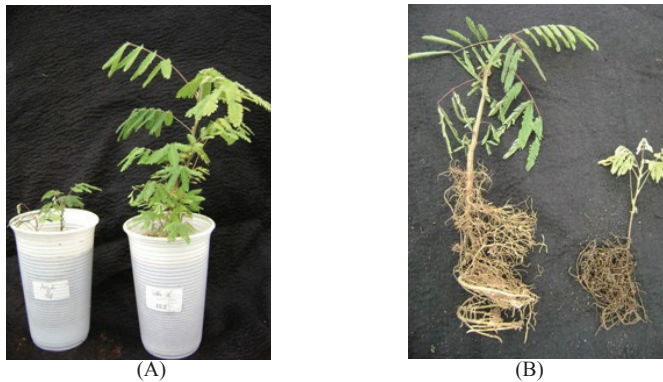
3 Resultados e Discussão

Do total de 188 plantas avaliadas, 70% apresentaram nódulos em suas raízes, com maior nodulação em solos provenientes de áreas sob fragmentos florestais, correspondendo a 59%, enquanto áreas sob cultivos de milho, pupunha e soja, apresentaram 41% da nodulação. Esse resultado pode indicar

que áreas sob fragmentos florestais mantêm melhores condições para o desenvolvimento e manutenção dos microrganismos do solo, em especial os rizóbios.

Foi observado um aumento de 25% em altura e 30% no diâmetro do caule, respectivamente, nas plantas noduladas em relação àquelas que não formaram nódulos (Figura 1).

Figura 1: (A) Planta não nodulada (esquerda) e planta com nódulos (direita). (B) Raiz nodulada (esquerda) e não nodulada (direita)

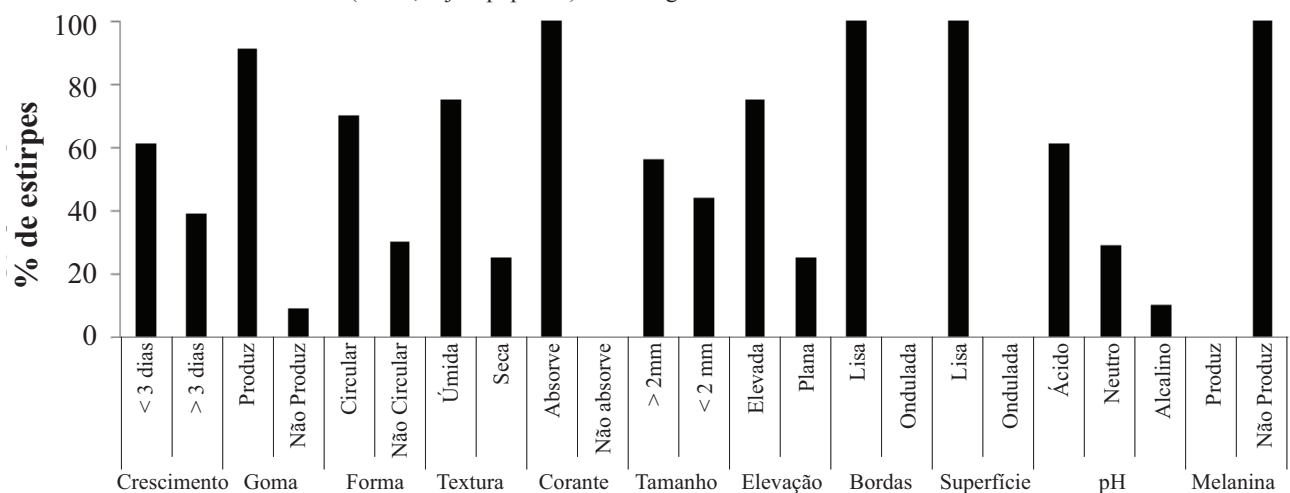


Fonte: O autor.

A caracterização morfológica dos isolados avaliados mostrou que 61% têm crescimento rápido (≤ 3 dias), 56% possuem tamanho de colônia (> 2 mm), 70% forma circular, 75% textura úmida, 91% produzem goma e 75% das colônias são elevadas. Todos os isolados apresentaram colônias com bordas e superfícies lisas e absorveram o corante do meio de

cultura (Figura 2). A estirpe utilizada como referência neste trabalho (SEMIA6165) diferenciou-se dos resultados obtidos de todos os isolados, em apenas três características, sendo: forma não circular, ausência de produção de goma e não caracterizadas como elevadas.

Figura 2: Características fenotípicas das estirpes de rizóbios isoladas de nódulos de bracinga, utilizados como planta isca, após cultivo em solo sob culturas anuais (milho, soja e pupunha) e sob fragmentos florestais



Fonte: Dados da pesquisa.

Na avaliação fisiológica, observou-se que 61%, 29% e 10%, dos isolados modificaram o meio de cultura, com manitol como fonte de carbono em meio ácido, neutro e alcalino, respectivamente (Figura 2). Esta modificação de pH do meio também foi observada em outros estudos, com rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi, também em meio de cultura contendo

manitol como fonte de carbono (TAN; BROUGHTON, 1982; MARTINS; NEVES; RUMJANECK, 1997). Neste trabalho, a maioria dos isolados apresentou crescimento rápido, com formação de colônias em no máximo três dias de incubação. Os rizóbios seguem uma tendência típica em relação à modificação do pH do meio, em que os de crescimento lento

geralmente alcalinizam o meio, enquanto os de crescimento rápido acidificam o meio de cultura (MARTINS; NEVES; RUMJANECK, 1997). No presente estudo, todos os rizóbios que apresentaram crescimento rápido modificaram o pH do meio para ácido. Esta mudança de pH promovido pelo rizóbio no meio de cultura pode ser devido à utilização preferencial de açúcares pelos rizóbios de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos e compostos de nitrogênio pelos rizóbios de crescimento lento, com consequente liberação de cátions (TAN; BROUGHTON, 1982).

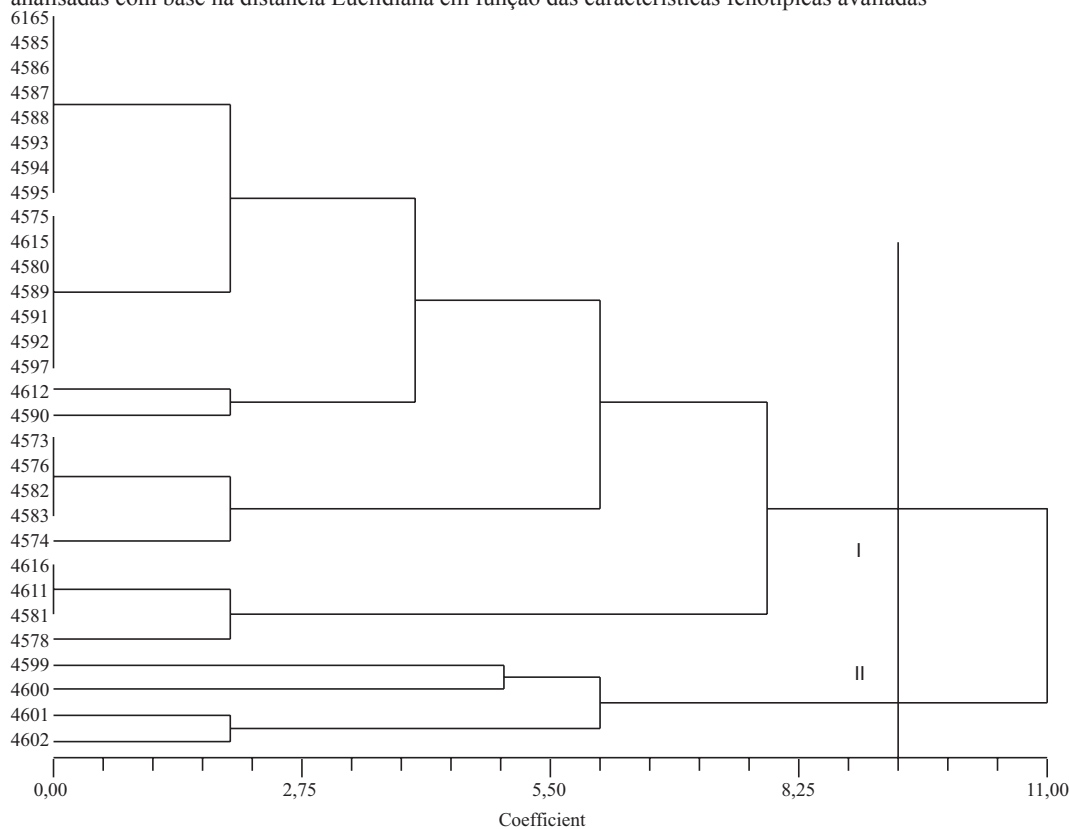
Já quanto à produção de melanina, nenhum isolado produziu o pigmento, característica fisiológica que também não foi observada na estirpe referência (SEMIA6165). A detecção da produção de melanina por estirpes de rizóbio foi previamente descrita por autores (ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002; CUBO *et al.*, 1997). Neste mesmo estudo foi utilizada para analisar o agrupamento de isolados de rizóbio

simbiontes de feijoeiro.

A formação de melanina pode estar relacionada à proteção contra estresses ambientais, principalmente compostos fenólicos originados da degradação da matéria orgânica do solo (BORTHAKUR; LAMB; JOHNSTON, 1987). Foi observado que os solos de onde foram isolados rizóbios sem esta característica fenotípica apresentavam baixo teor de matéria orgânica (GIONGO *et al.*, 2006). Por outro lado, a produção de melanina foi observada em rizóbios nativos, capazes de nodular feijoeiro, de solos provenientes de áreas com elevado teor de matéria orgânica (SÁ, 2001). Neste trabalho, não foi uma característica útil para diferenciação entre os isolados.

Os dados obtidos das características fenotípicas foram agrupados e os resultados representados graficamente através de um dendrograma. Houve a distribuição dos isolados em dois grandes grupos: grupo I, com 86%, e grupo II com 14% dos isolados (Figura 3).

Figura 3: Agrupamento das estirpes IPR-*Ms* isoladas de nódulos da bracatinga e a estirpe referência (6165), analisadas com base na distância Euclidiana em função das características fenotípicas avaliadas



Fonte: Dados da pesquisa.

Dentro do grupo I, os isolados foram distribuídos em 4 subgrupos com 100% de similaridade, sendo o maior grupo composto pelas estirpes: IPR-*Ms* 4585, 4586, 4587, 4588, 4593, 4594, 4595 e a estirpe referência SEMIA6165. Ainda no grupo I, apenas as estirpes IPR-*Ms* 4612, 4590, 4574 e 4578 não se agruparam com 100% de similaridade, evidenciando uma baixa diversidade fenotípica entre os isolados. O grupo II englobou 4 estirpes, das quais IPR-*Ms*

4599 e 4600 são provenientes de áreas de solo sob cultivo de milho e IPR-*Ms* 4601 e 4602 de áreas de solo sob fragmentos florestais, todas pertencentes ao município de Bela Vista do Paraíso (Figura 3).

Segundo Greande e Hungria (2004) e Pinto, Hungria e Mercante (2007), as análises com base em características morfofisiológicas são ferramentas úteis para caracterizar e agrupar estirpes de rizóbios.

A utilização da bracatinga como planta isca, cultivada em solos provenientes de áreas sob cultivo (milho, soja e pupunha) e sob fragmentos florestais, proporcionou elevado número de isolados com capacidade de nodular a planta, tornando possível a construção de um banco de dados, para futura validação da eficiência desses isolados.

Nas áreas avaliadas, não há registros de inoculação com rizóbio da bracatinga, portanto acredita-se que exista uma comunidade presente nos solos, com distribuição generalizada pelo Estado do Paraná, com elevada capacidade de nodular a planta.

Portanto, através da continuidade do processo de seleção dos isolados, almeja-se obter estirpes eficientes de rizóbios específicos para bracatinga, visando à utilização da associação planta-microrganismos, para a recuperação de áreas com solos degradados no Estado do Paraná.

4 Conclusão

Os solos do Paraná possuem estirpes de rizóbios nativos capazes de formar nódulos em bracatinga, tanto em áreas sob cultivos, quanto em áreas sob fragmentos florestais.

O histórico de origem dos solos não teve influência na diversidade das estirpes encontradas.

Referências

- ANDRADE, D.S.; MURPHY P.; GILLER, K.E. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.
- ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa, 1994.
- BAGGIO, A.J. *Estudio sobre el sistema agroforestal tradicional de la bracatinga (Mimosa scabrella Benth.) en Brasil: productividad, manejo de residuos y elaboracion de compost*. Madrid. Tese (Doutorado) - Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1994.
- BORTHAKUR, D.; LAMB, J.W.; JOHNSTON, A.W. Identification of two of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol. Gen. Genetics*, v.207, p.155-160, 1987.
- CHUEIRE, L.M.O. *et al. Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro*. Londrina: Embrapa, 2003.
- CUBO, T. *et al.* Expression of the rzhobium leguminosarum biovar phaseoli melA gene in other rhizobia does not required the presence of the nifA gene. *Aust. J. Plant Physiol.*, v.24, p.195-203, 1997.
- CUBO, M.T. *et al.* Melanin productions by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, n.7, p.1812-1817, 1988.
- FIGUEIREDO, M.V.B. *et al. Microrganismo e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Agrolivros, 2008.
- GAIAD, S.; CARPANEZZI, A.A. Ocorrência de *Rhizobium* em leguminosas de interesse silvicultural para a Região Sul. *Pesq. Agro. Bras.*, v.19, p.156-158, 1984.
- GIONGO, A. *et al.* Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Bio. Fert. Soils*, v.43, p.593-598, 2006.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, v.36, p.1389-1398, 2004.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA, 1997.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
- MARCHIORI, J.N.C. *Dendrologia das angiospermas: leguminosas*. Santa Maria: UFSM, 1997.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.
- PELEGRIN, R. *et al.* Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v.33, p.219-226, 2009.
- PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Poliphasic characterization of Brazilian Rhizobium tropici strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.*, v.39, p.1851-1864, 2007.
- SÁ, E.L.S. *Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (Phaseolus vulgaris) em solos ácidos de Cunha - SP*. 2001. 109f. Tese (Doutorado em Ciência - Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2001.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system, 1994.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. *Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999.
- TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. *Soil Biol. Biochem.*, v.14, p.295-299, 1982.
- VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, 1970.
- XAVIER, G.R. *et al.* Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Rev. Caatinga*, v.19. n.1, p.25-33, 2006.