



Características de bactérias de nódulos de jurema preta nativas de solos da Caatinga⁽¹⁾.

Stella Jorge de Carvalho Neta⁽²⁾; Aleksandro Ferreira da Silva⁽³⁾; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁽⁴⁾; Lindete Míria Vieira Martins⁽⁵⁾; Tânia Lúcia da Costa⁽⁶⁾; Ana Dolores Santiago de Freitas⁽⁷⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da UFRPE, Embrapa semiárido e CNPq.

⁽²⁾ Estudante de Agronomia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, PE; stellajcarvalho@gmail.com; ⁽³⁾ Doutorando – Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; ⁽⁴⁾ Pesquisador – Embrapa Semiárido; ⁽⁵⁾ Professora Titular; Universidade do Estado da Bahia; ⁽⁶⁾ Doutoranda - Botânica; Universidade Federal Rural de Pernambuco; ⁽⁷⁾ Professora colaboradora – Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RESUMO: A caracterização cultural de rizóbios é uma das primeiras etapas para o processo de seleção desses organismos. Este estudo objetivo avaliar a diversidade cultural de bactérias de nódulos de jurema preta nativas de solos do semiárido de Pernambuco. Isolados de nódulos de jurema preta foram obtidos cultivando a leguminosa em amostras de solo coletadas em áreas sob vegetação de caatinga. Após o crescimento das colônias isoladas, foram determinadas as seguintes características culturais: acidez do meio, tempo de crescimento, tamanho, forma, aparência, transparência, cor e elevação das colônias e presença, quantidade e tipo de muco. Dos 129 isolados obtidos, 95% amplificaram *nifH* e/ou *nodC*. Os isolados autenticados foram agrupados de acordo com suas características fenotípicas e distribuídos em grupos a 100% de similaridade. Com base nas características fenotípicas dos isolados autenticados, observou-se que todos os isolados apresentaram 100% de crescimento rápido com predomínio de isolados que acidificam o meio de cultura.

Termos de indexação: *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., rizóbios, fixação biológica de nitrogênio.

INTRODUÇÃO

A principal formação vegetal do Semiárido brasileiro é a caatinga (Lima Júnior et al., 2014). Neste tipo de vegetação, o gênero *Mimosa* merece destaque em função de sua grande contribuição no estrato arbóreo. As juremas (*Mimosa* spp.), por exemplo, são algumas das espécies mais abundantes na maioria dos trabalhos de levantamento realizados em áreas de caatinga (Araújo Filho, 2013). Porém, embora já sejam conhecidos os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN) no desenvolvimento de indivíduos pertencentes ao gênero, poucos estudos têm sido realizados para avaliar a diversidade de rizóbios

simbiontes dessas leguminosas na região Semiárida do Nordeste brasileiro.

Sabe-se que, em ecossistemas naturais, a FBN é a principal porta de entrada de nitrogênio (N), seja através de relações simbióticas (entre leguminosas e rizóbios) ou por meio de micro-organismos diazotróficos endofíticos e/ou de vida livre (Cleveland et al., 2010). A FBN por meio da simbiose entre leguminosas e bactérias de nódulos, genericamente denominadas rizóbios, permite que leguminosas nodulantes sejam mais bem estabelecidas (com maior crescimento) do que árvores não leguminosas quando ambas estão sobre solos pobres em N (Sylla et al., 2002). A simbiose tem como consequência a troca de benefícios entre o macro e o microsimbionte, de modo que a planta assimila a amônia, que é fornecida pelas bactérias, e em troca fornece os carboidratos provenientes da atividade fotossintética aos micro-organismos (Lindström et al., 2010).

A caracterização morfológica de colônias de rizóbios é um passo fundamental que permite uma primeira aproximação para avaliação da diversidade das populações e representa um primeiro diagnóstico do perfil das populações no solo na ocasião da coleta. Nesse sentido, tendo em vista a escassez de trabalhos com a espécie, o presente estudo teve por objetivo avaliar a diversidade cultural de bactérias de nódulos de jurema preta nativas de solos do Semiárido de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de nódulos de jurema preta foram obtidos cultivando a leguminosa em amostras de solo coletadas em áreas sob vegetação de caatinga, localizadas em quatro municípios do Semiárido de Pernambuco (**Tabela 1**), acondicionadas em vasos com capacidade para 500 g. Amostras compostas dos solos foram coletadas



na camada de 0 a 20 cm, em seis parcelas delimitadas aleatoriamente em campo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições. As sementes, obtidas de plantas matrizes de um fragmento de caatinga localizado em Patos, PB, foram submetidas a desinfestação superficial em etanol (70%) por 3 minutos e hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos (Freitas et al., 2014). Em seguida, 4 sementes foram semeadas por unidade experimental, deixando-se, após o desbaste, uma planta por vaso. Por ocasião da coleta (aos 112 dias após a germinação), as raízes foram separadas da parte aérea e os nódulos foram destacados, contados e submetidos ao isolamento.

O isolamento das bactérias foi procedido com os nódulos ainda frescos, em placas de Petri com meio de cultura YMA (Vincent, 1970), com vermelho Congo. As placas foram incubadas a 28 °C e o aparecimento das colônias monitorado diariamente. Após o aparecimento das colônias características, os isolados bacterianos foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol e incubadas por até 10 dias. Após o crescimento das colônias isoladas, foram determinadas as seguintes características culturais: acidez do meio, tempo de crescimento, tamanho, forma, aparência, transparência, cor e elevação das colônias e presença, quantidade e tipo de muco.

Para a autenticação, os isolados foram submetidos a técnica da amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC* por Polymerase Chain Reaction – PCR, como sugerido por Fernandes Jr. et al. (2013). A técnica foi utilizada visando à otimização do trabalho, uma vez que o teste de autenticação em casa de vegetação demanda maior espaço de tempo. Foram considerados autenticados os isolados que amplificaram, no mínimo, um dos genes. Os dados da caracterização fenotípica dos isolados autenticados foram codificados em um sistema binário (1 – positivo e 0 – negativo) a partir do qual foi gerado o dendrograma de similaridade, utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de similaridade de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do isolamento foram obtidos e caracterizados 129 isolados. Após a caracterização, todos os isolados foram submetidos à amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC* por PCR, sendo este o critério de autenticação. Do total de isolados, 95% amplificaram *nifH* e/ou *nodC* (Tabela 2). Os

isolados autenticados foram agrupados de acordo com suas características fenotípicas e distribuídos em grupos a 100% de similaridade. O dendrograma foi construído com base nas características que mais diferenciaram os isolados, o que possibilitou a formação de 15 grupos.

Com base nas características fenotípicas dos isolados autenticados, observou-se que todos os isolados apresentaram 100% de crescimento rápido. Alguns trabalhos demonstram que leguminosas arbóreas são predominantemente noduladas por rizóbios de crescimento rápido. Fterich et al. (2011), ao realizar a caracterização fenotípica de isolados de nódulos de *Prosopis farcta* cultivada em solos de regiões áridas da Tunísia, obtiveram 100% de isolados de crescimento rápido. Da mesma forma, Teixeira et al. (2010), em solos da região Semiárida do Nordeste brasileiro, observaram que todos os isolados obtidos a partir de *M. tenuiflora* apresentavam colônias de crescimento rápido. Na Arábia Saudita, Shetta et al. (2011) ao analisarem as características de isolados de leguminosas arbóreas, observaram que todos os isolados foram de crescimento rápido.

O gênero *Mimosa* tem sido frequentemente nodulado por β -rizóbios (Reis Júnior et al., 2010). Segundo Bontemps et al. (2010), espécies de *Mimosa* se associam principalmente com *Burkholderia*. Algumas espécies de *Burkholderia* apresentam características de crescimento rápido (Chen et al., 2007; Chen et al., 2008), o que pode explicar a obtenção exclusiva de isolados de crescimento rápido nodulando a espécie de *Mimosa* (jurema preta) utilizada no presente estudo. Segundo Sprent (1994), bactérias de crescimento rápido são comuns e mais adaptadas às regiões áridas. Recentemente, a obtenção de isolados de crescimento rápido nodulando o gênero *Mimosa* também foi verificada por Freitas et al. (2014). Os autores verificaram que 100% dos isolados obtidos de *M. paraibana* e *M. tenuiflora* foram de crescimento rápido.

Quanto à alteração de pH em meio de cultura, 76% dos isolados acidificaram e 24% não alteraram o pH. A predominância de isolados com reação ácida também foi verificada por Fterich et al. (2011) em estudo com leguminosa arbórea. Para a quantidade de muco, 97% dos isolados produziram muito muco (exopolissacarídeos). A alta capacidade de produção de exopolissacarídeos tem sido abordada na literatura como uma das características que está envolvida no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições edafoclimáticas adversas, como por exemplo, temperatura elevada (Silva et al., 2007).



CONCLUSÕES

Solos do Semiárido pernambucano apresentam uma população de bactérias de nódulos de jurema preta estabelecida.

Todos os isolados de rizóbio encontrados no presente estudo, nativos de solos sob caatinga, são bactérias de crescimento rápido e que apresentaram em sua maioria reação ácida em meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO FILHO, J.A. Manejo pastoril sustentável da caatinga. Recife, PE: Projeto Dom Helder Câmara, 2013. 200p.
- BONTEMPS, C., ELLIOTT, G., SIMON, M.F., REIS JUNIOR, F.B., GROSS, E., LAWTON, R.C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M.F.; FARIA, S.M.; SPRENT, J. I. & YOUNG, J.P.W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, 19:44-52, 2010.
- CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; CHOU, J.H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W. & VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:2174-2179, 2008.
- CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.B.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J. L. & VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:1055-1059, 2007.
- CLEVELAND, C.C.; HOULTON, B.Z.; NEILL, C.; REED, S.C.; TOWNSEND, A.R. & WANG, Y.P. Using indirect methods to constrain symbiotic nitrogen fixation rates: a case study from an Amazonian rain forest. *Biogeochemistry*, 99:1-13, 2010.
- FERNADES JÚNIOR, P.I.; MORGANTE, C.V.; GAVA, C.A.T.; SANTOS, C.A.F.; CUNHA, J.B.A.; MARTINS, L.M.V. Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes nifH e nodC em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. *Petrolina: Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico*, 2013. 6p.
- FREITAS, A.D.S.; BORGES, W.L.; ANDRADE, M.M.M.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; MULATO, B.M. & LYRA, M.C.C.P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. *African Journal of Microbiology Research*, 8:788-796, 2014.
- FTERICH, A.; MAHDHI, M.; CAVIEDES, M.A.; PAJUELO, E.; RIVAS, R.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D. & MARS, M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Arch Microbiol*, 93:385-397, 2011.
- LIMA JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L.J.O.; GIONGO, V.; LIMA, R.L.F.A.; SAMPAIO, E.V.S.B. & MENEZES, R.S.C. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. *Cientia Forestalis*, 42:289-298, 2014.
- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A. & ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161:453-463, 2010.
- MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & BRUSSARD, L. Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros, Lavras, 2008. 768p.
- REIS JÚNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol*, 186:934-946, 2010.
- SHETTA, N.D.; AL-SHAHARANI, T.S. & ABDEL-AAL, M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 10:410-418, 2011.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V. B.; CARVALHO, F.G.; SILVA, M.L.R.B. & SILVA, A.J.N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 37:16-21, 2007.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos- theory? *Plant Soil*, 161:1-10, 1994.
- SYLLA, S.N.; NDOYE, I.; GUEYE, M.; BA, A.T. & DREYFUS, B. Estimates of biological nitrogen fixation by *Pterocarpus lucens* in a semi-arid natural forest park in Senegal using ¹⁵N natural abundance method. *African Journal of Biotechnology*, 1:50-56, 2002.
- TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R. & RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:201-208, 2010.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

Tabela 1: Principais características das áreas de caatinga localizadas em municípios do Agreste e Sertão de Pernambuco.

Municípios/ Características	Caruaru	São João	Serra Talhada	Petrolina
Mesorregião	Agreste	Agreste	Sertão	Sertão
Coordenadas	8°16'53" S 35°58'25" W	08°52'32" S e 36°22'00" W	7°59'7" S 38°17'34" W	9°23'39" S 40°30'35" W
Altitude (m)	561	716	443	380
Precipitação média anual (mm)	764	885	686	577
Temperatura média anual (°C)	22,5	21,1	25,2	26,3
Tipo de solo	Argissolo Amarelo	Neossolo Regolítico	Luvissolo	Argissolo Vermelho- Amarelo

Tabela 2: Características fenotípicas dos grupos de bactérias obtidas de nódulos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*).

Grupos/ Nº de isolados	Características dos isolados ¹					Nº de isolados/município ²			
	AM	TCr	pH	QM	TC	PT	ST	CR	GR
Grupo 1 (15)	NifH	R	A	M	<1	1	4	8	2
Grupo 2 (1)	NodC	R	A	M	<1	0	0	1	0
Grupo 3 (2)	NifH/NodC	R	A	M	<1	0	1	0	1
Grupo 4 (3)	NifH	R	A	P	<1	0	3	0	0
Grupo 5 (2)	NifH	R	N	M	>2	1	1	0	0
Grupo 6 (35)	NifH	R	A	M	>2	11	1	2	21
Grupo 7 (23)	NifH	R	A	M	1-2	3	4	13	3
Grupo 8 (10)	NifH/NodC	R	A	M	1-2	0	4	6	0
Grupo 9 (1)	NifH	R	A	M	<1	0	0	0	1
Grupo 10 (1)	NifH	R	A	M	1-2	1	0	0	0
Grupo 11 (3)	NifH	R	A	M	>2	2	0	0	1
Grupo 12(12)	NifH	R	N	M	<1	0	3	6	3
Grupo 13 (1)	NifH/NodC	R	N	M	<1	0	1	0	0
Grupo 14 (2)	NifH/NodC	R	N	M	1-2	0	1	1	0
Grupo 15 (12)	NifH	R	N	M	1-2	0	9	3	0

¹AM – Amplificação dos genes NifH e/ou NodC; TCr - tempo de crescimento (R: rápido ≤ 3 dias); pH do meio (A: ácido, N: neutro); QM - quantidade de muco (M: muito, P: pouco); TC – tamanho da colônia (>2 mm, 1-2 mm, <1 mm).

²Municípios – (PT: Petrolina, ST: Serra Talhada, CR: Caruaru, GR: Garanhuns).