



## Caracterização Molecular de Isolados de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Obtidos em Área de Mata de Restinga do Parque Natural Municipal de Grumari, RJ<sup>1</sup>.

**Samuel Ribeiro Passos<sup>(2)</sup>; Rafaela Eloi de Almeida Alves<sup>(2)</sup>; Cândido Barreto de Novais<sup>(2)</sup>; Alexandre Cardoso Baraúna<sup>(3)</sup>; Verônica Massena Reis<sup>(4)</sup>; Silvia Regina Goi<sup>(5)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do PNPd-CAPES e CNPq – CAPES, Ciência Sem Fronteira

<sup>(2)</sup> Bolsistas de Pós Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; [passos.samuel@gmail.com](mailto:passos.samuel@gmail.com); <sup>(3)</sup> Aluno de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; <sup>(4)</sup> Pesquisadora Embrapa-Agrobiologia; <sup>(5)</sup> Professora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro IF-DCA.

**RESUMO:** Leguminosas arbóreas são espécies de plantas comumente encontradas nas Restingas, principalmente indivíduos da sub-família *Mimosoideae*. A simbiose entre as espécies da sub-família *Mimosoideae* e bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser uma estratégia para o estabelecimento dessa população de plantas. Esta simbiose efetiva é mediada por bactérias da classe *beta-proteobacterias* denominadas beta-rizóbios. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil molecular de 33 isolados provenientes de solo sob mata de restinga, acessados utilizando a técnica e Box-PCR. Foram utilizadas como plantas isca *Mimosa pudica* e *Mimosa candolei*. O perfil de Box-PCR obtido, discriminou a especificidade por planta isca, sendo todos os isolados provenientes de *M. candolei* agrupados em um único ramo. Os isolados provenientes de *M. pudica* apresentaram perfis dispostos em todo o dendrograma. Observa-se ainda especificidade por parcela amostrada. Em conclusão, é possível observar especificidade de beta-rizóbios por planta isca e parcelas amostrais, sendo estas, similares entre si e dissimilares com as estirpes padrão de rizóbio.

**Termos de indexação:** *Mimosa* sp., Box-PCR, Beta-rizóbios

### INTRODUÇÃO

As bactérias que formam nódulos em leguminosas são popularmente conhecidas como rizóbios (Moreira e Siqueira, 2006). Essas bactérias contribuem para a sustentabilidade das comunidades de plantas, principalmente leguminosas, pela capacidade de promover a entrada no sistema de altos níveis de nitrogênio, via fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

Esta simbiose é de extrema importância para espécies da sub-família *Mimosoideae*, que são árvores com ampla distribuição em regiões tropicais

e subtropicais, e que também tem sido amplamente utilizadas na recuperação de áreas degradadas (Lima et al., 2015).

O termo beta-rizóbio utilizado para denominar bactérias fixadoras de nitrogênio ondulante em leguminosas foi proposto por Moulin et al., (2001). Posteriormente vários trabalhos têm sido executados e reportam alta diversidade de beta-rizóbios associados a leguminosas arbóreas (Reis Jr, et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi promover a caracterização molecular de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas em área de mata de restinga no Parque Natural Municipal de Grumari, RJ.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Área de estudo

A área de estudo foi selecionada em trecho de Mata de Restinga no Parque Natural Municipal de Grumari, na cidade do Rio de Janeiro – RJ. Para a coleta das amostras de solo, foram demarcadas 10 parcelas de 10X20 m (23° 2'50.40"S/ 43°32'8.21"W) e cada parcela foi dividida em 4 sub-parcelas. Foi realizado a caracterização da vegetação na área.

Para a obtenção das bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), foi implantado um experimento de "plantas isca" em casa de vegetação, utilizando-se o solo das sub-parcelas como inóculo. Foram utilizadas como "plantas isca" as leguminosas arbóreas *Mimosa pudica* (dormideira) e *Mimosa candolei* (arranha-gato). Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, usando vasos com solo de cada sub-parcela, adicionado de areia estéril na proporção de 1:1. As sementes foram esterilizadas e pré-germinadas em laboratório e posteriormente transferidas para os vasos, onde cresceram por 90 dias. No momento da coleta, os nódulos foram destacados das raízes, desinfestados



superficialmente e esmagados em placas de petri contendo meio de cultivo YMA (Yeast Mannitol Agar). As colônias obtidas foram repicadas para confirmação da pureza e estocadas. Os isolados obtidos foram caracterizados morfológicamente (diâmetro da colônia, cor e tipo de borda, aspecto e pH) após 8 dias de cultivo.

#### Caracterização molecular

Com o objetivo de avaliar a similaridade genética dos isolados obtidos, procedeu-se um novo cultivo dos isolados, seguido da extração de DNA genômico e o perfil molecular foi obtido com auxílio da técnica de PCR- BOX (Versalovic et al., 1994). As reações de BOX-PCR foram realizadas segundo descrito em (Kaschuk et al., 2006) empregando 50 µg de DNA molde e o iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994). As condições de amplificação foram: Tampão 1X; dNTPs 300 µM de cada; MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM; 2,0 µM do iniciador; e 1 U de DNA polimerase (GoTAq Flexi DNA Polymerase - Promega), seguidos de 94°C por 7 min; 35 ciclos de 94°C 1', 53°C 1', 65°C 8' e 65°C por 15 min para extensão final. Os fragmentos foram separados em gel de agarose (1,5%, p/v) por 360 min a 65V. Os perfis de bandas obtidos foram submetidos à análise de similaridade pelo programa Bionumerics e o coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise química do solo indicaram valores de pH do solo ligeiramente ácidos, com média a altas concentrações de alumínio tóxico e sódio, baixos teores de Cálcio, Magnésio, Potássio e Fósforo.

O dendrograma de similaridade é apresentado na Figura 1. No dendrograma de similaridade foram observados 4 grandes grupos: no grupo 1 foram agrupados perfis de BFN das estirpes BR 3267 (*Bradyrhizobium* sp) e BR 3454 (*Burkholderia nodosa*) já descritas como nodulíferas, sendo pertencentes à classe das alphaproteobactérias e betaproteobactérias respectivamente.

No grupo 2 foram observadas novamente estirpes padrão de *Burkholderia mimosarum* e *Ensifer melioli* e o isolado P3S4-5, oriundo dos nódulos obtidos de *Mimosa pudica*.

No grupo 3 foram localizadas 83% dos isolados obtidos a partir das plantas de mimosa e nesse grupo não foi identificada nenhuma estirpe padrão utilizada. Dentro do grupo 3, nota-se o sub-grupo 3.1 abrangendo 100% dos isolados oriundos de *Mimosa*

*candollei* e 11% dos isolados oriundos de *Mimosa pudica*. Dentro deste sub-grupo é possível observar no ramo 3.1.1.1, que o isolado denominado P3S4-2 *M. pudica* e P3S1-9 *M. candollei* apresenta perfil box muito similar, sendo possivelmente a mesma estirpe. Este isolado foi capaz de formar nódulos com as duas espécies de mimosa.

Já para *M. candollei* no ramo 3.1.1.2 é possível observar que o principal condicionante do agrupamento foi o ponto de coleta. Cerca de 89% dos isolados deste ramo são oriundos da sub-parcela 2. Já no ramos 3.1.2 este efeito é repetido, sendo o local de coleta a sub-parcela 1.

No grupamento 3.2 estão agrupadas 61% dos isolados obtidos dos nódulos de *M. pudica*. Nos ramos 3.2.1 e 3.2.2 é nítido o agrupamento pelo local de coleta, sendo os ramos diferenciados pelos isolados da parcela 3 e parcela 4.

No grupo 4 estão alocadas 22% dos isolados oriundos de *M. pudica*, sendo que o isolado P3S2-2 ficou agrupado com mais dois isolados de *Burkholderia*. Os isolados P3S1-4, P3S1-3 e P3S2-6 se agruparam e apresentaram maior proximidade com a estirpe BR 10215 (*Ensifer mexicans*). No grupo 3, pode-se também observar a inserção da estirpe padrão BR 322 (*Rhizobium tropici*) que já foi descrita como rizóbio efetivo na nodulação com *Mimosa* (Menna et al., 2006).

Estes resultados sugerem grande diversidade genética entre os isolados pelo número de grupos formados pelos perfis BOX-PCR. Resultados similares são descritos por Liu et al., (2011) na avaliação de BFN isoladas de espécies de mimosa oriundas de diferentes províncias da China.

É possível observar que os grupamentos formados pelas BNFL oriundas de *M. candollei* apresentaram similaridade superior a 50% e que, dentro dos grupos a similaridade é maior que 80%. Este fato pode estar ligado à especificidade de nodulação por isolados de rizóbio.

Em relação à distribuição dos isolados oriundos de *M. pudica*, nota-se um menor grau de especificidade pela distribuição desses isolados nos 3 dos 4 grupamentos ilustrados no dendrograma da figura 1. Esta pode ser indicação de uma maior capacidade de nodulação de *M. pudica* com estirpes geneticamente distintas, tanto alfa como beta-rizóbios, como já encontrado por alguns autores: Wang et al., (2011) descrevem o alfa-rizóbio *Rhizobium vallis* como nova espécie nodulante em *Mimosa pudica*, *Phaseolus vulgaris* e *Indigofera spicata*. Elliott et al., (2007) descrevem eficiência na nodulação dos beta-rizóbios *Cupriavidus taiwanensis* e *Burkholderia phymatum* com *M.*



*putida*. Ferreira et al., (2012) descrevem eficiência com *Cupriavidus necator*. Mishra et al., (2012) avaliando os isolados de *M. putida*, através da filogenia de vários marcadores moleculares, relatam a predominância de beta-rizóbios.

### CONCLUSÕES

Foi possível isolar rizóbios associados a *Mimosa putida* e *M.candollei* utilizando solo da restinga como inóculo.

Foi identificada alta especificidade quanto à nodulação em *M. candollei*.

O local de coleta foi discriminante quanto ao padrão de agrupamento dos isolados.

*M. putida* apresenta maior capacidade de nodulação com diferentes rizóbios quando comparada com *M. candollei*.

*M. putida* apresentou isolados em grupamentos contendo alpha e beta-rizóbios.

O solo apresenta teores elevados de sódio e baixa disponibilidade de macronutrientes.

### AGRADECIMENTOS

Ao PNPd-Capes, Embrapa Agrobiologia e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### REFERÊNCIAS

ELLIOTT, G.N., CHEN, W.-M., CHOU, J.-H., WANG, H.-C., SHEU, S.-Y., PERIN, L., REIS, V.M., MOULIN, L., SIMON, M.F., BONTEMPS, C., SUTHERLAND, J.M., BESSI, R., DE FARIA, S.M., TRINICK, M.J., PRESCOTT, A.R., SPRENT, J.I., JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa spp.* and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist*, 173:168-180, 2007.

FERREIRA, P. A., BOMFETI, C. A., SILVA JÚNIOR, R. DA, SOARES, B. L., SOARES, C. R. F. S. & MOREIRA, F. M. DE S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47:85-95, 2012.

LIMA, K.D.R., CHAER, G.M., ROWS, J.R.C., MENDONÇA, V., DE RESENDE, A. Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de piçarra na caatinga. *Revista Caatinga*, 28: 203-213, 2015.

LIU, X.Y., WEI WU, EN TAO WANG, BIN ZHANG, JOMO MACDERMOTT, AND WEN XIN CHEN. Phylogenetic relationships and diversity of  $\beta$ -rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China *Int J Syst Evol Microbiol* February, 61:334-342, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N. & MARTÍNEZ-ROMERO, E.

Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29:315-332, 2006.

MISHRA, R.P., TISSEYRE, P., MELKONIAN, R., CHAINTREUIL, C., MICHÉ, L., KLONOWSKA, A., GONZALEZ, S., BENA, G., LAGUERRE, G., MOULIN, L. Genetic diversity of *Mimosa putida* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: Investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology*, 79:487-503, 2012.

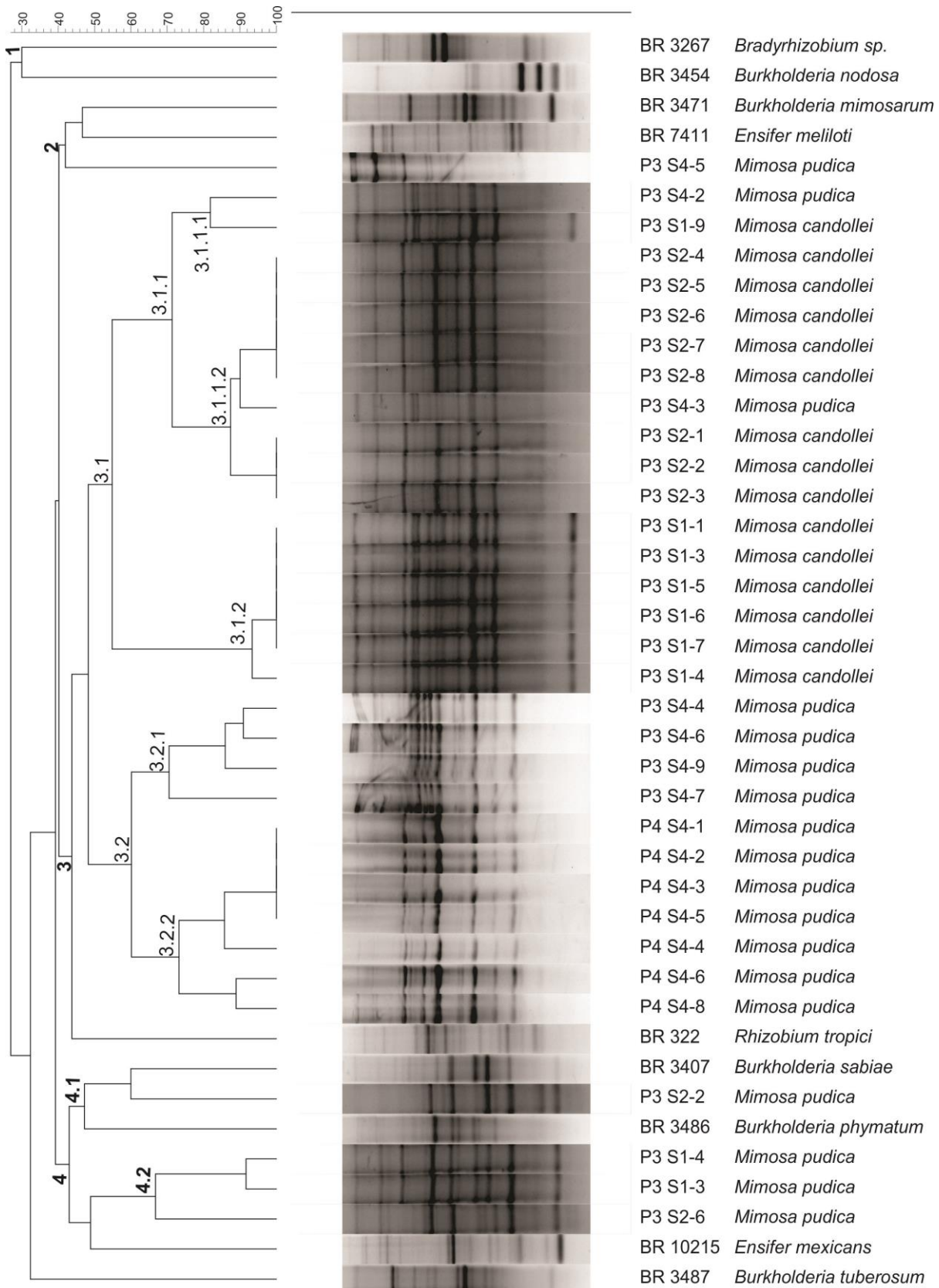
MOULIN L, MUNIVE A, DREYFUS B & BOIVIN-MASSON C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950, 2001.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2.ed. atual. e ampl. Lavras: Ufla, 2006. 729p

REIS JR, F. B dos, SIMON, M.F., GROSS, E., BODDEY, R.M., ELLIOTT, G.N., NETO, N.E., DE FATIMA LOUREIRO, M., DE QUEIROZ, L.P., SCOTTI, M.R., CHEN, W., NORÉN, A., RUBIO, M.C., DE 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 Phytologist*, 186:934-94, 2010.

WANG, F., WANG, E.T., WU, L.J., SUI, X.H., LI JR., Y., CHEN, W.X. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2582-2588, 2011.





**Figura 1** – Dendrograma e similaridade oriundo dos isolados obtidos dos nódulos das “plantas isca” *Mimosa pudica* e *Mimosa candollei*, cultivadas em solo proveniente de um trecho de mata de restinga no Parque Natural Municipal de Grumari – RJ.