



Simbioses de rizóbio com nove espécies de leguminosas florestais em viveiro do Quadrilátero Ferrífero⁽¹⁾.

Márcia Rufini⁽²⁾; Jacqueline Savana da Silva⁽³⁾; Paula Rose de Almeida Ribeiro⁽⁴⁾; Amanda Azarias Guimarães⁽⁵⁾; Amanda Monique Costa⁽⁶⁾; Fatima Maria de Souza Moreira⁽⁷⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da VALE SA, Fapemig, Capes e CNPq.

⁽²⁾ Pós-doutoranda, bolsista Fapemig; Universidade Federal de Lavras (UFLA); Lavras, Minas Gerais; marciarufini@gmail.com; ⁽³⁾ Mestranda, bolsista CNPq; UFLA; jacsavana@yahoo.com.br; ⁽⁴⁾ Pós-doutoranda, bolsista Fapemig; UFLA; paularoseribeiro@gmail.com; ⁽⁵⁾ Pós-doutoranda, bolsista Capes; UFLA; amandaazarias@gmail.com; ⁽⁶⁾ Graduanda em Engenharia Ambiental, bolsista PIBIC/CNPq; UFLA; amanda_monique07@hotmail.com; ⁽⁷⁾ Professora titular; UFLA; fmoreira@dcs.ufla.br.

RESUMO: A degradação ambiental causada pela mineração resultou na criação de leis ambientais que obrigam as empresas mineradoras a mitigar os impactos causados por essa atividade. Diante disso a utilização de espécies arbóreas leguminosas inoculadas com estirpes de rizóbios é uma alternativa indicada para a recuperação e sucessão vegetal de solos impactados. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de mudas de leguminosas arbóreas utilizadas para recuperação de áreas degradadas pela mineração. Foram obtidas 93 estirpes de bactérias dos nódulos de 9 espécies de leguminosas arbóreas, que foram submetidas ao experimento de autenticação com siratro (*Macropodium atropurpureum*). O experimento foi realizado em casa de vegetação em DIC com três repetições. Para verificar a diversidade genética de 43 estirpes realizou-se a extração do DNA genômico e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram formados sete grupos culturais e os gêneros encontrados foram *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, *Variovorax*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Pseudomonas*, *Terriglobus* e *Sphingomonas*. Nos experimentos de autenticação 33 % dos isolados nodularam pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium* e *Paenibacillus*. Os resultados mostraram alta diversidade genética, fenotípica e simbiótica.

Termos de indexação: Leguminosas arbóreas, fixação biológica de nitrogênio, recuperação de áreas degradadas.

INTRODUÇÃO

A mineração é um dos setores básicos da economia brasileira responsável por disponibilizar para a sociedade os recursos essenciais para o seu desenvolvimento. A atividade é responsável pela

produção de matéria-prima para diversos produtos que utilizamos cotidianamente e pela geração de empregos diretos. Entretanto, essa atividade causa impactos na sua área de exploração, como a retirada da vegetação, causando perda da matéria orgânica do solo e consequente perda de seus nutrientes (Campello, 1998).

O papel protetor da vegetação para o solo é de suma importância, uma vez que reduz consideravelmente as chances de degradação do mesmo. Por isso, a ausência de uma alta diversidade vegetal nas áreas impactadas demandará um programa de recuperação baseado no conceito de sustentabilidade ecológica, atentando-se para a biodiversidade, a ciclagem de nutrientes e o fluxo de energia, objetivando o resgate da produtividade daquele solo.

Um solo produtivo é caracterizado por possuir uma alta diversidade de espécies vegetais em um mesmo cultivo ou em sucessão, elevados níveis de matéria orgânica e diversidade da vida no solo, além da eficiência na utilização de água, luz e nutrientes. As primeiras técnicas dos programas de recuperação visam à adição de mais matéria orgânica do que a quantidade mineralizada. Para isso, é importante o uso de espécies que adicionem carbono (C) e nitrogênio (N) ao sistema, além de fornecer material formador de serapilheira (Franco et al., 2003).

O emprego de espécies arbóreas leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) é uma alternativa potencialmente satisfatória para a revegetação de áreas degradadas. Uma das principais características dessa simbiose é o aumento da biomassa e a entrada de N no sistema (Moreira & Siqueira, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio promovida pela simbiose entre leguminosas arbóreas e BFNNL pode ser maximizada por uma maior diversidade dessas últimas em áreas degradadas uma vez que são capazes de se associarem com várias espécies de leguminosas, aumentando a resiliência dos



processos microbiológicos naquele solo (Melloni et al., 2006; Moreira & Siqueira, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo analisar a diversidade genotípica, fenotípica e simbiótica de BFNNL que estabelecem simbioses com 9 mudas de leguminosas arbóreas coletadas no viveiro do Centro de Tecnologia de Ferrosos - Miguelão (CTF) da VALE S/A.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de nódulos

As mudas das espécies de leguminosas arbóreas foram coletadas no viveiro do Centro de Tecnologia de Ferrosos - Miguelão (CTF) da VALE S/A, localizado na Zona Rural do município de Nova Lima/MG. Foram coletadas duas mudas das espécies de *Acacia farnesiana*, *Anadenanthera colubrina*, *Clitoria fairchildiana*, *Erythrina speciosa*, *Inga marginata*, *Inga sessilis*, *Mimosa caesalpinifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Plathymenia reticulata*.

Foi utilizada apenas uma muda de cada espécie arbórea coletada, da qual foram retirados seis nódulos que foram lavados posteriormente em água corrente e submetidos ao processo de isolamento das estirpes.

Isolamento e caracterização cultural

Os nódulos retirados das espécies arbóreas foram lavados e hidratados em água destilada esterilizada, por 30 minutos. Posteriormente, os nódulos foram desinfestados superficialmente em álcool etílico 95% durante 30 segundos e em H₂O₂ por três minutos, em seguida foram lavados em água destilada esterilizada por seis vezes. Os nódulos foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928). As colônias foram repicadas até obtenção de cultura pura.

As estirpes foram avaliadas quanto as seguintes características culturais: tempo de crescimento (1-3 dias, rápido; 4-5 dias, intermediário; 6-10, lento; mais de 10 dias, muito lento) e alteração do pH do meio (ácido, neutro e alcalino).

Autenticação das estirpes

Para a autenticação das estirpes foi utilizado o siratro (*Macropitium atropurpureum*). As plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 1:1 (v:v).

Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação que possuíam 49 e 44 estirpes, respectivamente. O delineamento foi inteiramente

casualizado com três repetições. Os tratamentos foram: inoculação com as estirpes testadas; dois controles positivos inoculados com as estirpes UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium* sp.) com comprovada eficiência em siratro (Florentino et al., 2009) e SEMIA 656 (*Bradyrhizobium* sp.), autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculante para siratro; e dois controles negativos, não inoculados, com baixa concentração de N mineral, e outro com alta concentração de N mineral (52,5 mg L⁻¹).

De acordo com a necessidade da planta, foi adicionada solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950) com ¼ de força, esterilizada. Para a inoculação (1 mL por semente), as estirpes selecionadas foram crescidas em meio 79 líquido sob agitação. Foram plantadas duas sementes por tubete e após uma semana foi feito o desbaste restando apenas uma planta por tubete.

Os experimentos foram conduzidos por 45 dias e após esse período foi analisada a presença ou ausência de nodulação.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Um total de 43 estirpes foi submetido ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para isso, foi realizada a extração do DNA genômico das estirpes pelo método de lise alcalina como descrito por Niemann et al. (1997).

A amplificação parcial do gene 16S rRNA, primers, condições dos ciclos e sequenciamento foram os mesmos utilizados por Costa et al. (2013). A qualidade das sequências foram avaliadas com uso do programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA) e posteriormente foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 93 estirpes bacterianas a partir do isolamento dos nódulos. Destas, 75 % apresentaram crescimento rápido, 13 % crescimento intermediário e 12 % crescimento lento. Em relação à alteração do pH do meio de cultura, 58 % das estirpes acidificaram, 17 % mantiveram neutro e 25 % alcalinizaram. As espécies arbóreas que apresentaram maior diversidade cultural foram *Erythrina speciosa* e *Plathymenia reticulata*, além de maior número de estirpes.

Nos experimentos de autenticação das 93 estirpes avaliadas apenas 32 estirpes foram capazes de estabelecer simbiose com o siratro. O siratro estabeleceu simbiose com estirpes de sete



grupos culturais.

Resultados de alta diversidade cultural como os obtidos no presente trabalho têm sido relatados na literatura (Jesus et al., 2005; Florentino et al., 2009). Algumas das estirpes simbiotes do siratro pertencentes aos grupos culturais RA e LAL foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (RA), *Bradyrhizobium* (LAL), *Mesorhizobium* (RA), *Burkholderia* (RA) e *Paenibacillus* (RA), resultado este que confirma a promiscuidade dessa espécie (Lima et al., 2009).

Os resultados obtidos pelas análises das sequências mostraram que houve diversidade de gêneros de BFNNL, além da presença de estirpes de gêneros considerados não nodulíferos (Tabela 3). Das 43 estirpes sequenciadas, 12 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*, nove como *Bradyrhizobium*, cinco como *Paenibacillus*, quatro como *Burkholderia*, três como *Mesorhizobium* e dois como *Variovorax*. Os gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mucilaginibacter*, *Polaromonas*, *Dyella*, *Sphingomonas* *Pseudomonas* e *Terriglobus* foram representados por apenas uma estirpe.

Foram identificadas estirpes de BFNNL pertencentes aos filos α e β Proteobacteria corroborando assim com resultados anteriores onde estirpes desses dois filos provenientes de nódulos de siratro e feijão caupi foram isoladas (Costa et al., 2013; Lima et al., 2009).

CONCLUSÕES

As estirpes isoladas das mudas de leguminosas arbóreas neste trabalho possuem alta diversidade fenotípica, genotípica e simbiótica.

O estudo contribuiu significativamente para o conhecimento da diversidade de BFNNL e para os primeiros passos para o desenvolvimento de novas pesquisas que têm por objetivo avaliar a potencialidade destes isolados para uso como inoculantes nas leguminosas de origem.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES, FAPEMIG, FAPEMA e ao projeto CRA RDP – 00136/10 FAPEMIG/PAPESP/FAPESPA/VALE S.A., pela concessão de bolsas de estudo e pesquisa.

REFERÊNCIAS

CAMPELLO, E.F.C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L.E.; MELLO, J.W. (Eds.). Recuperação de áreas degradadas. Viçosa: SOBRAD/DPS-UFV, 1998. p. 183-196.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48:1275-1284, 2013.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola** (USP. Impresso), v. 66, p. 667-676, 2009.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. D.; CAMPELLO, E. F. C. (2003). Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. **Sistemas Agroflorestais e Desenvolvimento Sustentável**, Mato Grosso do Sul, 1-24.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw – Hill, 1928. 145 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular, 347; Solução, 2).

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H. V. et al. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 477-484, 1997.



Tabela 1: Identificação de estirpes com base nas seqüências do 16S rRNA mais similares encontradas no GenBank. Os isolados são oriundos de diferentes espécies de leguminosas arbóreas cultivadas em viveiro no Centro de Tecnologia de Ferrosos - CTF Miguelão da Vale S/A.

Hospedeiro de origem	Códigos isolados ⁽¹⁾	Código UFLA	Nodulação ⁽²⁾	Grupos culturais ⁽³⁾	PB ⁽⁴⁾	Seqüência mais similar encontrada no		
						Espécie	Si %	Acesso
<i>A. farnesiana</i>	E3B1	01-060	-	RAL	781**	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	99	HM204922.1
<i>A. farnesiana</i>	E3b2	01-056	+	RA	751***	<i>Rhizobium</i> sp.	100	HM486519.1
<i>A. farnesiana</i>	E3a	01-057	-	RA	1011***	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	EU143651.1
<i>A. colubrina</i>	AV4a	01-084	-	RA	659**	<i>Burkholderia</i> sp.	100	JQ316419.1
<i>A. colubrina</i>	AV6b	01-086	-	RAL	803***	<i>Dyella</i> sp.	99	JX173884.1
<i>A. colubrina</i>	AV5a	01-080	-	RA	518***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KM926553.1
<i>A. colubrina</i>	AV1a	01-082	-	RA	554***	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EF612325.1
<i>A. colubrina</i>	AV6a	01-083	ND	RA	319**	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	HE575948.1
<i>C. fairchildiana</i>	S3b2	01-096	+	LAL	765**	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>C. fairchildiana</i>	S5b	01-102	-	RA	691**	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	EU571150.1
<i>C. fairchildiana</i>	S1c	01-097	-	RAL	996***	<i>Variovorax</i> sp.	99	KJ184862.1
<i>C. fairchildiana</i>	S2a	01-100	+	LAL	835***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933598.1
<i>E. speciosa</i>	M4a	01-026	+	LAL	1251*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>E. speciosa</i>	M2c2b	01-027	-	RA	1276*	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AF511494.1
<i>E. speciosa</i>	M2b	01-037	-	RA	1319*	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AF510630.1
<i>E. speciosa</i>	M2a	01-034	+	RA	1153*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	97	AB480767.1
<i>E. speciosa</i>	M1C	01-024	-	RA	712**	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KF933542.1
<i>E. speciosa</i>	M5c2	01-028	-	RA	775***	<i>Burkholderia</i> sp.	100	EU827486.1
<i>E. speciosa</i>	M5c1	01-029	+	RA	822***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1
<i>I. marginata</i>	IF4a1a	01-075	-	RA	1217*	<i>Burkholderia</i> sp.	91	JN172099.1
<i>I. marginata</i>	IF4a2	01-071	-	RA	1289*	<i>Paenibacillus</i> sp.	93	JX266342.1
<i>I. marginata</i>	IF5a2a	01-074	-	RAL	609**	<i>Polaromonas</i> sp.	99	AB730465.1
<i>M. caealpinifolia</i>	SC2a	01-002	+	RA	1330*	<i>Burkholderia</i> sp.	100	FJ025136.1
<i>I. sessilis</i>	IM2a	01-016	-	RA	825**	<i>Rhizobium</i> sp.	100	AB456618.1
<i>I. sessilis</i>	IM5a	01-013	-	LAL	996***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FJ390937.1
<i>I. sessilis</i>	IM2c	01-017	-	RA	950***	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	EU571131.1
<i>I. sessilis</i>	IM5b2	01-014	-	RA	881***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1
<i>I. sessilis</i>	IM5b1	01-012	-	LAL	994*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
<i>I. sessilis</i>	IM6b1	01-015	-	RA	772***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933537.1
<i>M. caesalpinifolia</i>	SC3a	01-008	-	RA	614***	<i>Terriglobus</i> sp.	100	AY587228.1
<i>M. caesalpinifolia</i>	SC4a1	01-006	-	LAL	917***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113099.2
<i>P. gonoacantha</i>	JR6b1	01-064	-	RA	992***	<i>Variovorax</i> sp.	99	KJ184862.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR6a	01-068	-	RA	1281*	<i>Rhizobium</i>	99	JX524430.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR5b	01-070	-	RA	802**	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JX855240.1
<i>P. gonoacantha</i>	JR3a	01-065	-	LAL	753***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113099.2
<i>P. reticulata</i>	V5B1	01-045	+	LAL	1188***	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FJ025101.1
<i>P. reticulata</i>	V4a	01-049	-	LAL	1406*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	96	AY238503.1
<i>P. reticulata</i>	V5b2	01-050	-	RA	1351*	<i>Paenibacillus</i> sp.	93	JF768727.1
<i>P. reticulata</i>	V2a	01-040	+	RA	1284*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	98	AB636289.1
<i>P. reticulata</i>	V4d	01-038	+	RA	1384*	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	EF612325.1
<i>P. reticulata</i>	V5b3	01-051	-	RA	1285*	<i>Bacillus</i> sp.	97	DQ275185.1
<i>P. reticulata</i>	V1A	01-052	-	RA	850**	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EF612325.1
<i>P. reticulata</i>	V6c1	01-039	+	RA	779***	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1

⁽¹⁾ Códigos dos Isolados: Sigla alfabética correspondente ao hospedeiro de origem, o primeiro número se refere ao nódulo utilizado para o isolamento e a letra a seguir se refere à estirpe.

⁽²⁾ Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de siratro; sinal negativo (-): ausência de nódulos nas plantas de siratro; ND: não determinado.

⁽³⁾ Características culturais no meio 79: (RA) tempo de crescimento rápido com acidificação do meio, (RAL) tempo de crescimento rápido alcalinizando o meio, (LAL) tempo de crescimento lento alcalinizando o meio; NPB: número de pares de bases; SI (%): percentagem de similaridade no GenBank.

⁽⁴⁾ *:contig; **:foward; ***:reverse.