



## Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de leguminosas arbóreas no Maranhão<sup>(1)</sup>

**Tainara Louzada Rodrigues<sup>(2)</sup>; Kátia Pereira Coelho<sup>(3)</sup>; Paula Rose de Almeida Ribeiro<sup>(4)</sup>; Alana das Chagas Ferreira Aguiar<sup>(5)</sup>; Emanuel Gomes de Moura<sup>(6)</sup>; Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(7)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq de F.M.S. Moreira.

<sup>(2)</sup> Graduanda em Agronomia, Bolsista FAPEMIG/CAPES, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, tainara\_lavras@hotmail.com; <sup>(3)</sup> Doutoranda, Bolsista FAPEMA, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFLA, katiapc2004@yahoo.com.br; <sup>(4)</sup> Pós-doutoranda, Bolsista Vale/FAPEMIG, Departamento de Ciência do Solo – DCS/UFLA, paularoseribeiro@gmail.com; <sup>(5)</sup> Professora, Universidade Federal do Maranhão, alanaaguiar@elo.com; <sup>(6)</sup> Professor Adjunto II, Universidade Estadual do Maranhão, egmoura@elo.com; <sup>(7)</sup> Professora Titular do DCS/UFLA, Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, nível 1A, fmoreira@dcs.ufla.br

**RESUMO:** As leguminosas arbóreas *Acacia mangium* e *Gliricidia sepium* são espécies introduzidas no Brasil e apresentam alta taxa de fixação biológica de N<sub>2</sub>, podendo ser utilizadas como forragem, recuperação de áreas degradadas, adubo verde, dentre outros. O presente trabalho, teve como objetivo avaliar a diversidade fenotípica e genética de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, isoladas de nódulos de *A. mangium* e *G. sepium*, cultivadas em sistemas de aléias no Maranhão e sua capacidade simbiótica com plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Para isso, foram amostradas 20 plantas de cada uma das espécies de leguminosas, coletando-se 10 nódulos por planta e realizando-se isolamento, caracterização cultural, identificação parcial do gene 16S rRNA, e analisada a capacidade simbiótica dessas estirpes bacterianas em plantas de *M. atropurpureum*, em experimento com garrafas long neck (500 mL), preenchidas com solução nutritiva, esterilizada. A partir da análise das características morfológicas, foi realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para 25 e 10 estirpes de *G. sepium* e *A. mangium*, respectivamente. Todas as estirpes isoladas de *G. sepium*, foram de crescimento rápido, e as nodulíferas em *M. atropurpureum* identificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Para *A. mangium*, apenas estirpes de crescimento lento e intermediário identificadas nos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* foram capazes de formar nódulos em simbiose com plantas de *M. atropurpureum*.

**Termos de indexação:** *Acacia mangium*, *Gliricidia sepium*, gene 16S rRNA.

### INTRODUÇÃO

A leguminosa arbórea *Acacia mangium* Willd. é nativa do México, América do Sul e Central e *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. nativa do Norte da Austrália, Nova Guiné e Indonésia. Estas

leguminosas são utilizadas para forragem, reflorestamento, adubação verde, cercas vivas, entre outros. Estas apresentam capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras devido a características como o rápido crescimento, baixo requerimento nutricional, tolerância a acidez do solo e elevada fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN). No Maranhão estas leguminosas são cultivadas em sistemas de aléias (consórcio entre leguminosas e culturas agrícolas), com poda periódica das leguminosas e utilização dos ramos para cobertura morta e adubação verde.

A FBN é realizada por bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, que são capazes de se associarem ao sistema radicular de plantas leguminosas formando estruturas denominadas “nódulos”, onde ocorre a FBN. Estas bactérias transformam o N<sub>2</sub> atmosférico em amônia, forma assimilável pela planta, sendo capaz de suprir total ou parcialmente a demanda de N das culturas.

Solos brasileiros apresentam alta diversidade de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (BFN) (Guimarães et al., 2012; Marra et al., 2012; Costa et al., 2013.). Entretanto, no Estado do Maranhão há poucos estudos sobre a ocorrência, identificação e potencial de aplicação dessas bactérias. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade fenotípica e genética de BFN, isoladas de nódulos de *A. mangium* e *G. sepium*, no Maranhão e sua capacidade simbiótica com plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*).

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Caracterização da área

A coleta de nódulos foi realizada no município de Brejo – MA, em área de de 1,41 ha. O clima é classificado do tipo Aw (Köppen), Equatorial quente e úmido, com alta pluviosidade nos meses de janeiro a junho e seca com déficit hídrico de julho a dezembro. As precipitações variam entre 1.600 a 2.000 mm anuais. A temperatura média local



encontra-se na faixa de 27,5° C, com variações entre 22 e 36° C. O solo da área é classificado como Latossolo Amarelo distrocoeso (EMBRAPA, 2013), com as seguintes características químicas: M.O (g/dm<sup>3</sup>): 30,6; pH (CaCl<sub>2</sub>): 4,7; P (resina), K, Ca, Mg, H+Al e Al: 20,2; 0,92; 26,5; 9,6; 54,8 e 2,1 mg/dm<sup>3</sup>, respectivamente.

A área experimental era constituída de vegetação secundária (capoeira), a qual foi eliminada para implantação de cultivos de arroz. Nenhum tipo de inoculante foi aplicado na área.

Para a instalação do sistema de cultivo em aléias, foi realizada correção da acidez (2 t ha<sup>-1</sup> de corretivo) e correção dos baixos teores de fósforo (300 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato triplo). Posteriormente, a área foi plantada com leguminosas arbóreas, *Acacia mangium*, *Leucaena leucocephala*, *Glirícidia sepium* e *Clitoria fairchildiana*.

#### Coleta de nódulos, isolamento e caracterização cultural das estirpes bacterianas

Foram amostradas 20 plantas de cada uma das leguminosas, coletando-se 10 nódulos por planta. Os nódulos foram lavados em água corrente, secos em papel toalha e acondicionados em frascos contendo algodão e sílica gel. Posteriormente, estes foram hidratados em água destilada estéril por 30 minutos, seguido de desinfestação superficial por 30 segundos em álcool, 3 minutos em hipoclorito de sódio (3%) e lavados por seis vezes em água destilada estéril. Os nódulos foram macerados com pinça estéril em placas com meio 79 e incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias. As colônias foram repicadas até obtenção de cultura pura.

A caracterização cultural foi realizada em meio de cultura 79, também conhecido como YMA, com azul de bromotimol. As características analisadas foram: tempo de crescimento, rápido (1-3 dias), intermediário (4-5 dias), lento (6-10 dias) e alteração do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro).

#### Estirpes selecionadas para extração de DNA e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Um total de 35 estirpes foram selecionadas, 25 de *G. sepium* e 10 de *A. mangium*. As estirpes foram crescidas a 28 °C em meio 79 sólido. O DNA foi extraído usando a metodologia de lise alcalina, descrita 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 foi analisada por meio do programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA). As sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (National Center for

Biotechnology Information - NCBI), usando o BLAST.

#### Autenticação das estirpes

As 35 estirpes sequenciadas foram analisadas quanto a capacidade de estabelecer simbiose com plantas de *M. atropurpureum*, escolhido por ser altamente promiscua, apresentar crescimento rápido, alta disponibilidade de sementes e facilmente manipulada. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em garrafas de vidro (*long neck* 500 mL), contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) a ¼ de força, ambos esterilizados, e com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Como suporte para o desenvolvimento das raízes utilizou-se papel filtro.

A escarificação, desinfestação superficial e pré-germinação das sementes de *M. atropurpureum* foi realizada de acordo com Florentino et al. (2009). Os tratamentos foram: I – baixo N mineral (5,25 mg L<sup>-1</sup>) e inoculado com 1 mL de células crescidas em meio 79 líquido, de cada estirpe analisada; II – dois controles positivos, inoculados com as estirpes UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium* sp.) com comprovada eficiência em *M. atropurpureum* (Florentino et al., 2009) e SEMIA 656 (*Bradyrhizobium* sp.), autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculante para *M. atropurpureum*; III – dois controles negativos, não inoculados, com baixa concentração (5,25 mg L<sup>-1</sup>) de N mineral, para verificar possível contaminação e outro com alta concentração (52,5 mg L<sup>-1</sup>) de N mineral.

O experimento foi conduzido por 45 dias e ao final foi analisado a capacidade de nodulação de cada estirpe. Os dados foram analisados como ausência (-) ou presença (+) de nódulos.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 48 estirpes para *G. sepium* e 20 estirpes de *A. mangium*. Dessas, foi realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 25 e 10 estirpes para cada leguminosa, respectivamente (**Tabela 1**).

Todas as estirpes de *G. sepium* sequenciadas, apresentaram crescimento rápido, e com alteração do pH do meio de cultura, predominantemente alcalino. Para *A. mangium* as estirpes apresentaram crescimento rápido, intermediário ou lento. Entretanto, o pH do meio de cultura foi predominantemente alcalino e não houve estirpe que acidificou o meio de cultura (**Tabela 1**).

As estirpes de *G. sepium* foram identificadas nos seguintes gêneros: *Rhizobium* (17), *Massilia* (duas),



e uma em cada um dos gêneros *Bacillus*, *Bosea*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*. As estirpes de *A. mangium* foram identificadas nos gêneros *Bradyrhizobium* (cinco), *Bacillus* (duas), e uma em cada um dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Terriglobus* (Tabela 1).

Na autenticação das estirpes, os controles sem inoculação, com alto e baixo N mineral não foi verificado nodulação, indicando ausência de contaminação durante a condução do experimento. Das 35 estirpes autenticadas em plantas de *M. atropurpureum*, 13 foram capazes de estabelecer simbiose, com formação de nódulos radiculares. *Gliricidia sepium* e *A. mangium* apresentaram sete e seis estirpes nodulíferas, respectivamente. Todas as estirpes de *G. sepium* que nodularam, pertencem ao gênero *Rhizobium* e *A. mangium*, aos gêneros *Bradyrhizobium* (cinco) e *Mesorhizobium* (um). Entretanto, para *G. sepium*, houve estirpes identificadas como *Rhizobium*, com ausência de nodulação em *M. atropurpureum* (Tabela 1).

*Gliricidia sepium*, apresenta nodulação com estirpes bacterianas de crescimento rápido, principalmente do gênero *Rhizobium* (Acosta-Durán et al., 2002). Enquanto, *A. mangium* nodula com frequência com estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Perrineau et al., 2011).

Em nosso trabalho, as estirpes de *G. sepium* pertencentes ao gênero *Rhizobium*, e que não apresentaram nodulação em *M. atropurpureum*, possivelmente apresenta especificidade com a espécie hospedeira.

Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, são conhecidos pela sua capacidade de nodulação. Os gêneros *Bacillus*, *Bosea*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Massilia*, e *Methylobacterium*, não são nodulíferos, no entanto, podem atuar como promotores de crescimento em plantas por meio de solubilização de fosfato, produção de fitormônios, dentre outros (Chen et al., 2006; Marra et al., 2012; Costa et al., 2013).

## CONCLUSÕES

*Gliricidia sepium* apresenta estirpes de crescimento rápido, com maior ocorrência para o gênero *Rhizobium*.

*Acacia mangium* apresenta em sua maioria, estirpes de crescimento lento ou rápido e alcalinização do meio, com maior ocorrência para o gênero *Bradyrhizobium*.

Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, apresentam nodulação em plantas de *Macroptilium atropurpureum*.

## 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. Ao NTER-UEMA.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA-DURÁN, C. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Arch Microbiol, 178:161-164, 2002.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology, 34:33–41, 2006.

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.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro. 3 ed. 353 p. 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, 66:667-676, 2009.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. Applied and Environmental Microbiology, 78:6726-6733, 2012.

HOAGLAND, D. & ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California. Agriculture Experimental Station. Circular. 1950. 347p.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA S. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. Plant Soil, 357:289307, 2012.

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, 82:477-484, 1997.

PERRINEAU, M. M.; ROUXA, C. L.; FARIA, S. M. et al. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil, 34:376–384, 2011.

**Tabela 1** – Nodulação em *Macroptilium atropurpureum*, características culturais e identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Gliricidia sepium* e *Acacia mangium*, oriundas do município de Brejo, Maranhão. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

Código UFLA	Nodulação	Características Culturais	Extensão (pb)	Similaridade das sequências no GenBank		
				Espécies	Número de Acesso	(%)
<i>Gliricidia sepium</i>						
UFLA 01-887	-	RAL	439*	<i>Massilia</i> sp.	JX566630.1	99
UFLA 01-888	-	RA	1324	<i>Chryseobacterium</i> sp.	JF327645.1	98
UFLA 01-889	+	RAL	598*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-890	+	RN	1236	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-891	-	RAL	1322	<i>Massilia</i> sp.	JX566630.1	99
UFLA 01-892	+	RAL	760*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-893	+	RAL	1293	<i>Rhizobium</i> sp.	KM253159.1	99
UFLA 01-895	-	RN	843*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-896	-	RA	564*	<i>Klebsiella</i> sp.	DQ316102.1	100
UFLA 01-897	-	RAL	1313	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	88
UFLA 01-898	-	RAL	795	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-899	-	RAL	1287	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-900	+	RAL	1303	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855239.1	99
UFLA 01-901	-	RAL	1266	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855163.1	99
UFLA 01-902	-	RAL	933*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855163.1	99
UFLA 01-903	-	RN	683*	<i>Bacillus</i> sp.	KJ879598.1	100
UFLA 01-905	+	RAL	1285	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855166.1	99
UFLA 01-906	-	RAL	1292	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-907	-	RAL	1345	<i>Mesorhizobium</i> sp.	EU584257.1	98
UFLA 01-908	+	RAL	856*	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-909	-	RAL	724*	<i>Bosea</i> sp.	JX566529.1	100
UFLA 01-910	-	RA	1227	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-911	-	RA	1275	<i>Rhizobium</i> sp.	JX855240.1	99
UFLA 01-912	-	RA	1264	<i>Rhizobium</i> sp.	GU433459.1	99
UFLA 01-913	-	RAL	1253	<i>Methylobacterium</i> sp.	AM910533.1	99
<i>Acacia mangium</i>						
UFLA 01-940	-	RAL	1274	<i>Rhizobium</i> sp.	KF922663.1	100
UFLA 01-942	-	RAL	795*	<i>Bacillus</i> sp.	JQ316240.1	99
UFLA 01-943	-	RN	1326	<i>Bacillus</i> sp.	KC596006.1	100
UFLA 01-944	+	RAL	1342	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	94
UFLA 01-949	+	IN	419*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100
UFLA 01-950	-	RN	977*	<i>Terriglobus</i> sp.	AY587228.1	99
UFLA 01-953	+	IAL	924*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100
UFLA 01-955	+	LAL	768*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FR872439.1	100
UFLA 01-956	+	LAL	1250	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KC677617.1	100
UFLA 01-957	+	LAL	613*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100

Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de *M. atropurpureum*; sinal negativo (-): ausência de nódulos.

Características culturais (tempo de crescimento e alteração do pH) em meio 79 sólido: RA – rápido e ácido; RN - rápido e neutro; RAL – rápido e alcalino; IAL – intermediário e alcalino; LAL - lento e alcalino;

\*Somente forward, para as demais estirpes foi realizado o contig.