



Diversidade fenotípica e genotípica de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com leucena e sombreiro em sistema de cultivo aléias⁽¹⁾

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

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

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

RESUMO: *Leucena leucocephala* (leucena) e *Clitoria fairchildiana* (sombreiro) estão entre as espécies mais indicadas para utilização em sistema de cultivo em aléias. Este trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar a diversidade e identificar bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de *L. leucocephala* e *C. fairchildiana*, em um sistema de cultivo em aléias. A amostragem foi feita em um campo experimental localizado no Município de Brejo-MA, foram amostradas 20 plantas de cada espécie, coletando-se 10 nódulos por planta. Foram obtidas 41 estirpes oriundas dos nódulos de leucena e 42 de sombreiro, estas foram caracterizadas fenotipicamente, estirpes representantes dos fenótipos obtidos foram selecionadas para identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Concluímos que: I - *L. leucocephala* e *C. fairchildiana* estabelecem simbiose com rizóbios fenotipicamente diferentes. A simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio em leucena é realizada predominantemente com os gêneros *Mesorhizobium* e em sombreiro com *Bradyrhizobium*. II – Os gêneros endofíticos *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Paenibacillus* são encontradas colonizando nódulos de leucena, enquanto que *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter* e *Leifsonia*, são encontradas colonizando os nódulos de sombreiro. III - A autenticação das estirpes em *M. atropurpureum* confirmou a capacidade de nodular de estirpes de rizóbios pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Termos de indexação: rizóbio; leguminosas arbóreas; *Mesorhizobium*.

INTRODUÇÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (BFN) são consideradas microrganismos-chave por serem responsáveis pelo aporte de grande

quantidade de nitrogênio nos solos via fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com leguminosas. Esse processo é considerado econômica e ambientalmente vantajoso, por ser capaz de diminuir ou dispensar o uso de fertilizantes nitrogenados.

No trópico úmido, mais especificamente no Estado do Maranhão, o sistema de cultivo em aléias tem se demonstrado promissor, principalmente para pequenos agricultores (Moura et al., 2013). Este sistema consiste num consórcio entre árvores, preferencialmente leguminosas, e culturas de interesse econômico, as árvores são periodicamente podadas e seus ramos são utilizados como cobertura morta e adubo verde. *Clitoria fairchildiana* (sombreiro) e *Leucaena leucocephala* (leucena) estão entre as espécies mais indicadas para esse sistema (Moura et al., 2013) especialmente pela sua capacidade de estabelecer simbioses com bactérias fixadoras de N₂.

Entretanto, como é amplamente conhecido, a eficiência da FBN depende da compatibilidade dos dois simbiontes (leguminosa e bactéria). Em virtude do exposto, este trabalho teve como objetivos I) avaliar a diversidade fenotípica de espécies de BFN nodulíferas das leguminosas *L. leucocephala* e *C. fairchildiana*, em um sistema de cultivo em aléias, localizada em Brejo-MA; II) Identificar, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, estirpes isoladas de nódulos dessas leguminosas. III) autenticar as estirpes isoladas destas espécies pela capacidade de nodulação em siratro (*Macroptilium atropurpureum*).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O campo experimental está localizado no povoado Acampamento no município de Brejo, MA, Brasil. O clima da região é classificado como Aw, Equatorial quente e úmido, e o solo como



Latossolo Amarelo distrocoeso (EMBRAPA, 2013), cujo resultado da análise química foi: M.O (g/dm^3): 30,6; $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$: 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^3 , respectivamente. O sistema de cultivo em aléias é formado por cinco parcelas iguais de 42,5x70m, quatro delas semeadas com as leguminosas *C. fairchildiana*, *L. leucocephala*, *Acacia mangium*, e *Glirícidia sepium* no espaçamento de 2,5x0,5m e uma testemunha, sem leguminosas. A amostragem foi realizada coletando-se nódulos das raízes das leguminosas presentes nas aléias. Foram amostradas 20 plantas das espécies *C. fairchildiana* e *L. leucocephala*, coletando-se 10 nódulos por planta, os nódulos foram lavados em água corrente e conservados em frascos contendo sílica-gel.

Isolamento e caracterização fenotípica

Para o isolamento foram utilizados 22 nódulos de cada espécie de leguminosa. O isolamento e caracterização fenotípica das bactérias nodulíferas, foi realizado em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) com azul de bromotimol, precedido pela hidratação dos nódulos em água esterilizada por 30 minutos e desinfestação superficial com álcool (30 segundos), H_2O_2 (3 minutos) e água estéril (6 enxagues). 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. As características observadas foram: tempo de surgimento de colônias isoladas, alteração do pH do meio, produção de muco, detalhes ópticos, consistência, cromogênese, diâmetro, forma, elevação, borda e superfície da colônia. Baseado nos resultados desta caracterização representantes dos grupos morfoculturais obtidos foram selecionados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

A extração de DNA foi feita pela metodologia lise alcalina (Niemann et al., 1997). Na amplificação parcial do gene 16S rRNA, primers, condições dos ciclos e sequenciamento foram os mesmos utilizados por Costa et al. (2013). A qualidade das seqüências foi analisada por meio do programa BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Austin, TX, EUA). As seqüências foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI), usando o BLAST.

Autenticação das estirpes

As estirpes foram autenticadas utilizando sirato (*Macropitium atropurpureum*), espécie altamente promíscua, de crescimento rápido e fácil manuseio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente

casualizado com 3 repetições. Os tratamentos foram: 1-controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$); 2-controle sem inoculação com alta concentração de N mineral ($52,5 \text{ mg L}^{-1}$); 3-controles com inoculação (estirpes referência eficientes: UFLA 04-212 e SEMIA 656) e baixa concentração de N; 4-tratamentos com inoculação com as estirpes estudadas e baixa concentração de N. A condução do experimento foi feita em garrafas tipo *long neck* contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) a $\frac{1}{4}$ de força, ambos esterilizados em autoclave. O experimento foi conduzido durante 45 dias. A nodulação foi observada e os dados expressos como ausência (-) e presença (+) de nódulos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 41 estirpes de leucena e 42 de sombreiro, foram selecionadas 17 estirpes de leucena e 18 de sombreiro, representativas de cada grupo fenotípico encontrado para a identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A caracterização fenotípica demonstrou que *C. fairchildiana* e *L. leucocephala* são colonizadas por grupos de rizóbios morfoculturalmente diferentes apesar das plantas encontrarem-se na mesma área de estudo, o que provavelmente está associado a especificidade rizóbio-hospedeiro. Verificou-se que *L. leucocephala* apresenta tendência a colonização por estirpes de crescimento rápido e, em sua maioria, de reação neutra a alteração de pH, apesar de ter sido observada a presença de estirpes de crescimento intermediário e reação alcalina (Tabela1). Estudo tem demonstrado que a nodulação de leucena ocorre com grupos de rizóbios de crescimento rápido (Sanginga et al., 1995). Já para *C. fairchildiana*, as estirpes encontradas foram, em sua maioria, de crescimento intermediário e reação alcalina (Tabela1).

A similaridade entre as estirpes estudadas e as do GenBank variou entre 88% e 100%. *Bacillus* e *Mesorhizobium* ocorreram em ambas as leguminosas, em diferentes proporções. Dentre as estirpes de leucena analisadas, foram identificados os gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Mesorhizobium* e *Staphylococcus*. 73,9% das estirpes eram *Mesorhizobium sp.* observa-se que *Mesorhizobium* e *Rhizobium* estão entre os gêneros capazes de nodular leucena na Ásia e Américas do Sul e Central (de Lajudie et al., 1998; Wang et al., 1999). Em *C. fairchildiana* foram identificados os gêneros *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Mesorhizobium*, *Klebsiella*, *Arthobacter* e *Leifsonia* (Tabela 1).

Neste trabalho, além de rizóbios, bactérias endofíticas foram encontradas nos nódulos.



Estirpes pertencentes a classe Firmicutes, dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*, os mesmos encontrados neste estudo, tem sido isoladas de nódulos de leguminosas sem uma clara indicação de seu papel dentro do hospedeiro e são consideradas como endofíticas (Meyer et al., 2015). Trabalhos têm demonstrado que bactérias pertencentes aos gêneros *Arthobacter*, *Klebsiella* e *Bacillus* são encontradas na rizosfera, em associação com as raízes ou vivendo livremente no solo, e apresentam capacidade de promover aumento do crescimento vegetal (Kloepper et al., 1989; Glick, 1995). Além disso, *Arthobacter sp.*, pode estar associada com nódulos senescentes e envolvida com a perda de nitrogênio nestes nódulos (Webb et al., 2010). O gênero *Leifsonia*, por sua vez, engloba bactérias endofíticas encontradas em raízes de plantas como ginseng (Qiu et al., 2007).

Quanto ao teste de nodulação em sirato, verificou-se que o resultado foi positivo para os gêneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, com exceção das estirpes UFLA 01-923 e UFLA 01-936. Nos controles sem inoculação, com alta e baixa concentração de N mineral não foi verificada nodulação, indicando ausência de contaminação do experimento. Todas as estirpes pertencentes a gêneros não englobados no grupo dos rizóbios tiveram nodulação negativa (**Tabela 1**).

CONCLUSÕES

Leucena leucocephala e *Clitoria fairchildiana* estabelecem simbiose com rizóbios fenotipicamente diferentes, com predomínio dos gêneros *Mesorhizobium* em leucena e *Bradyrhizobium* em sombreiro.

Espécies não simbióticas (endofíticas) *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Paenibacillus sp.* são encontradas colonizando os nódulos de *L. leucocephala*, enquanto que *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Arthobacter sp.* e *Leifsonia sp.* são encontradas colonizando os nódulos de *C. fairchildiana*.

A autenticação com *M. atropurpureum* confirmou a capacidade de nodular de estirpes de rizóbios pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* isoladas destas espécies.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, CNPQ, FAPEMA e VALE S. A. pelas bolsas de estudos dos autores e financiamento da pesquisa. À Dra. Antonia Alice C. Rodrigues e toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia da UEMA e aos estudantes e professores da UFMA (Chapadinha) e PPG em Agroecologia-UEMA que auxiliaram na obtenção deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 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.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48:369–382, 1998.
- DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K. VEKEMAN, B. et al. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). Soil Biology & Biochemistry, 83: 1-11, 2015.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro. 3 ed. 2013. 353p.
- FRED, E. B. & WASKMAN, S. A. Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. Canadian Journal Microbiology, 41:109–114, 1995.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. T. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32p. (University of California. Circular, 347).
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, 7:39–43, 1989.
- MOURA, E. G.; SENA, V. G. L.; CORREA, M. S. et al. The Importance of an Alternative for Sustainability of Agriculture around the Periphery of the Amazon Rainforest. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 5: 70-78, 2013.
- 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.
- QIU, F. B.; HUANG, Y.; SUN, L. et al. *Leifsoniagin sengi* sp. nov., isolated from ginseng root. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 57:405–408, 2007.
- SANGINGA, N.; VANLAUWE, B.; DANSO, S. K. A. Management of biological N₂ fixation in alley cropping system: estimation and contribution to N balance. Plant and Soil, 174:119–141, 1995.
- WANG, E. T.; MARTINEZ-ROMERO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Leucaena leucocephala* in Mexican soils. Molecular Ecology, 8:711–724, 1999.



WEBB, K. J.; JENSEN, E. F.; HEYWOOD, S. et al.
Gene expression and nitrogen loss in senescing root

systems of red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of Agricultural Science*, 148: 579–591, 2010.

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 *C. fairchildiana* e *L. leucocephala*, coletadas no 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) 16S rRNA	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
				Espécies	Nº de Acesso	Similaridade (%)
<i>Leucaena leucocephala</i>						
UFLA 01-914	+	R/AL	1302	<i>Rhizobium</i> sp.	KF113106.2	99
UFLA 01-916	-	R/N	1341	<i>Bacillus</i> sp.	JX173281.1	100
UFLA 01-920	+	R/N	666*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	GQ847887.1	99
UFLA 01-921	+	R/N	895*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	100
UFLA 01-922	+	I/N	1294	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	97
UFLA 01-924	+	R/N	528*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	100
UFLA 01-925	+	R/N	874*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	JQ697665.2	99
UFLA 01-926	+	R/N	1308	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99
UFLA 01-927	+	R/AL	1303	<i>Mesorhizobium</i> sp.	HF931067.1	93
UFLA 01-929	+	R/N	840	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	88
UFLA 01-930	nd	R/N	639*	<i>Staphylococcus</i> sp.	JQ082128.1	99
UFLA 01-933	+	R/N	1339	<i>Mesorhizobium</i> sp.	HF931067.1	93
UFLA 01-934	+	R/N	560*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	JQ362360.1	99
UFLA 01-935	+	R/N	835*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	KM253153.1	97
UFLA 01-936	-	R/N	828*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99
UFLA 01-938	+	R/N	655*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	GQ847887.1	99
UFLA 01-939	+	R/N	737*	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB636289.1	99
<i>Clitoria fairchildiana</i>						
UFLA 01-959	+	I/AL	1253	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KC677617.1	99
UFLA 01-960	+	I/AL	784*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	99
UFLA 01-961	+	I/AL	1233	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114645.1	99
UFLA 01-963	+	I/AL	621*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF357613.1	100
UFLA 01-965	+	I/AL	792*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	99
UFLA 01-967	-	R/AC	624*	<i>Klebsiella</i> sp.	KF411348.1	99
UFLA 01-968	-	R/AL	1357	<i>Bacillus</i> sp.	KF254678.1	100
UFLA 01-969	-	R/N	698*	<i>Paenibacillus</i> sp.	KF750627.1	99
UFLA 01-971	+	R/AC	308*	<i>Arthobacter</i> sp.	FR745407.1	99
UFLA 01-972	-	I/AC	577*	<i>Paenibacillus</i> sp.	EU571197.1	99
UFLA 01-976	+	I/AL	1222	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114634.1	99
UFLA 01-977	+	I/AL	688*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF933597.1	100
UFLA 01-978	+	I/AL	1311	<i>Mesorhizobium</i> sp.	EU584257.1	94
UFLA 01-980	+	I/AL	1220	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114634.1	99
UFLA 01-981	+	ML/AL	804*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	JN085495.1	97
UFLA 01-982	-	I/AC	286*	<i>Leifsonia</i> sp.	FR750300.1	100
UFLA 01-984	+	I/AL	1310	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AY238503.1	94
UFLA 01-985	+	I/AL	770*	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	KF114645.1	100

Sinal positivo (+): presença de nódulos em *M. atropurpureum*; sinal negativo (-): ausência de nódulos em *M. atropurpureum*. Características culturais em meio 79 sólido: a) tempo de crescimento: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (5-10 dias); ML-muito lento (acima de 10 dias).b) Reação do pH em meio YMA com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcalino. *utilizada apenas a sequência forward; nd-não determinado.