

Diversidade de Isolados de Rizóbios de Leguminosas Nativas de Solos de Caatinga em Diferentes Estágios de Regeneração no Estado de Pernambuco

Diversity of Rhizobial Isolates from Soils of Caatinga under Different Regeneration Times in Pernambuco State, Northeast

*Indra Elena Costa Escobar*¹; *Aleksandro Ferreira da Silva*²; *Dalila Ribeiro Rodrigues*³; *Katherine Gomes Oliveira*⁴; *Tailane Ribeiro do Nascimento*⁴; *Rejane de Carvalho Nascimento*⁴; *Maria Idaline Pessoa Cavalcante*³; *Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos*⁵; *Ana Dolores Santiago de Freitas*⁵; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*⁶

Abstract

The aim of this study was to evaluate the cultural characteristics and symbiotic genes amplification patterns to estimate the diversity of bacteria from nodules in native legumes in areas of Caatinga areas with different regeneration process semi-arid region of Pernambuco State. Angico [*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan], jurema-preta [*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir.] and mulungu (*Erythrina velutina* Willd) seeds were planted in soils collected at mature and preserved Caatinga areas in “Agreste” eco-region (Garanhuns and Caruaru municipalities) and “Sertão” eco-region (Serra Talhada and Petrolina municipalities). The nodules were superficially disinfected and macerated in Petri plates containing YMA. At the same medium, the bacterial isolates were purified. The isolates were authenticated from the amplification of *nifH* and *nodC* genes duplex PCR reaction, the isolates were characterized culturally when are positive amplification. The diversity indices were calculated for the collection sites. The highest groups richness and diversity was recorded from the sites undergoing the regeneration process mainly at the Serra Talhada municipality.

Palavras-chave: Fabaceae, NFB, Semiárido.

Introdução

O Bioma Caatinga, único exclusivamente brasileiro e localizado em sua maior parte na região Nordeste, é caracterizado pelo ambiente semiárido, com baixas precipitações pluviométricas e altas temperaturas. Possui vegetação de porte baixo adaptada às condições áridas desse ecossistema, apresentando grande variação fisionômica (LEAL, et al., 2003; QUEIROZ, 2009). A Caatinga apresenta uma cobertura vegetal diversificada, sendo as leguminosas uma das mais importantes famílias do bioma. As leguminosas

¹Bolsista PNPd, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, (Univasf), Petrolina, PE

²Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

⁴Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

⁵Professora da UFRPE, Recife, PE.

⁶Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

presentes nesse ambiente apresentam grande importância econômica e ecológica. Essas espécies são potencialmente capazes de fixar nitrogênio atmosférico por meio da simbiose com bactérias radiculares genericamente denominadas de rizóbios.

A região da Caatinga está situada em áreas que estão sob constante pressão antrópica. O uso intensivo das florestas para a produção de lenha, agricultura e pecuária têm como consequência um mosaico de pequenas áreas abandonadas para regeneração espontânea, intercaladas a poucas áreas de caatinga madura, preservadas (SAMPAIO, 1995). O desmatamento reduz significativamente a resistência e a resiliência dos ecossistemas alterados (CORREIA et al, 2009), sendo a principal causa para a diminuição e/ou perdas na diversidade da comunidade microbiana do solo.

Dentre os micro-organismos do solo, as bactérias do grupo dos rizóbios destacam-se por seu importante papel ecológico nos ecossistemas. Essas bactérias têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas e são capazes de fixar nitrogênio atmosférico por meio da simbiose rizóbio-leguminosa (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008). Essas bactérias conferem, ainda, tolerância às plantas às condições adversas em diversos ambientes (FREITAS et al., 2007), sendo importantes nos processos de restauração de ambientes impactados.

Nesse contexto, por causa da importância ecológica e econômica das bactérias fixadoras de nitrogênio, o conhecimento sobre as comunidades de rizóbios além de gerar informação sobre a funcionalidade dessas bactérias em ambientes semiáridos, pode contribuir para o entendimento do papel dessas bactérias no processo de recuperação de áreas de Caatinga degradada.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias que formam nódulos em três leguminosas nativas em áreas de Caatinga preservada e em processo de regeneração em áreas do Semiárido ao longo do Estado de Pernambuco.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de solo de uma área de Caatinga preservada e não antropizada por pelo menos 40 anos e uma em processo de recuperação em quatro cidades do Semiárido pernambucano, duas no Agreste (Caruaru e Garanhuns) e duas no Sertão (Serra Talhada e Petrolina).

Para a obtenção dos nódulos foram utilizadas como plantas-isca angico (*Anadenanthera colubrina*), jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e mulungu (*Erythrina velutina*). As sementes foram desinfestadas superficialmente e plantadas em vasos contendo 500 g de solo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação por um período de 3 meses para as plantas de mulungu e 4 meses para angico e jurema-preta.

Ao final desse período, as plantas foram coletadas e as raízes separadas das partes aéreas e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. As raízes foram lavadas e os nódulos foram destacados manualmente. Para o isolamento das bactérias, até 20 nódulos de cada planta foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1% e macerados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com vermelho congo (VINCENT, 1970). As placas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento de colônias. As bactérias crescidas foram inoculadas sucessivas vezes em placas com meio YMA contendo azul de bromotimol e incubadas até a obtenção de colônias puras.

Todos os isolados obtidos foram submetidos à reação de duplex-PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013) como estratégia de autenticação das bactérias. As bactérias consideradas positivas para a amplificação dos fragmentos dos genes *nifH* e/ou ou *nodC* foram caracterizadas culturalmente de acordo com a alteração do pH, o tempo de crescimento e cor da colônia.

Os dados foram transformados em uma planilha binária para a elaboração de um dendrograma de similaridade por agrupamento com base no índice de Bray-Curtis e no algoritmo UPGMA. A partir dos grupos formados, foram calculados os índices de diversidade de acordo com os sítios de coleta e estádios de regeneração. De acordo com a frequência da ocorrência de cada isolado nos grupos formados no dendrograma, foi feito o agrupamento das áreas utilizando-se também o índice de Bray-Curtis e o algoritmo UPGMA. As avaliações de diversidade foram feitas com o uso do programa PaSt (HAMMER et al., 2001).

Resultados e Discussão

Um total de 306 bactérias foi isolado dos nódulos das plantas-isca (angico, jurema-preta e mulungu). Dentre os isolados obtidos, 210 apresentaram amplificação positiva para, pelo menos, um dos genes-alvo na reação de duplex-PCR. O agrupamento dos isolados no dendrograma de similaridade, de acordo com suas características culturais, formou 23 grupos, sendo os grupos 3 e 4 os que apresentaram os maior número de isolados, 57 e 50, respectivamente. Dentre os hospedeiros avaliados, jurema-preta foi a planta que obteve o maior número de isolados (123), seguida do angico (68) e do mulungu (19) (Tabela 1).

A maior parte das bactérias isoladas (86%) possui crescimento rápido. Essa característica tem sido relatada para bactérias isoladas de solos semiáridos (FREITAS et al., 2007; SANTOS et al., 2007). Segundo estes autores, a ocorrência de rizóbios de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada com aspectos ambientais dos locais onde são isolados.

Considerando-se os locais de coleta, a maior riqueza de espécies (*S*) foi encontrada em jurema-preta de áreas de regeneração de todos os locais de coleta (Garanhuns, Caruaru, Serra Talhada e Petrolina). Os maiores valores dos índices de Margalef e Shannon foram registrados, também, para jurema-preta, utilizada como planta-isca em solos de Serra Talhada, tanto em áreas de regeneração como em áreas de Caatinga preservada. Esses resultados sugerem uma preferência das bactérias encontradas nesses locais às plantas de jurema-preta. Altos índices de diversidade podem indicar a capacidade do sistema em manter o funcionamento desse grupo de micro-organismo, mesmo sob condição de estresse (SANTOS et al., 2007).

Tabela 1. Caracterização fenotípica dos grupos formados a partir do dendrograma de similaridade e o número de isolados, por hospedeiro (planta-isca), utilizados em casa de vegetação.

Grupos/ Nº de isolados	Características dos grupos								
	Amplif	TempC	pH	TC	FC	AC	mulungu	angico	jurema
Grupo 1 (1)	NodC	R	Ac	1-2	Circ.	Hom.	1	0	0
Grupo 2 (25)	NodC	R	Ác	1-2	Circ	Het	0	15	10
Grupo 3 (57)	NifH	R	Ác	1-2	Circ	Het	3	31	23
Grupo 4 (50)	NifH	R	Ác	>2	Circ	Het	3	11	35
Grupo 5 (2)	NifH /NodC	R	Ác	>2	Circ	Het	1	1	0
Grupo 6 (2)	Nif H	R	N	>2	Circ	Het	0	0	2
Grupo 7 (16)	Nif H	R	Ác	<1	Circ	Het	0	1	15
Grupo 8 (2)	NifH /NodC	R	Ác	<1	Circ	Het	0	0	2
Grupo 9 (1)	Nod C	R	Ác	<1	Circ	Het	0	0	1
Grupo 10 (3)	Nif H	R	Ác	>2	Circ	Het	0	0	3
Grupo 11 (4)	Nif H	R	Ác	<1	Circ	Hom	0	4	0
Grupo 12 (12)	Nif H	R	Ác	>2	Circ	Het	0	0	12
Grupo 13 (2)	NifH/NodC	R	N	1-2	Circ	Het	0	0	2
Grupo 14 (12)	Nif H	R	N	<1	Circ	Het	0	0	12
Grupo 15 (1)	NifH/NodC	R	N	>2	Circ	Het	0	0	1
Grupo 16 (1)	Nif H	R	Ác	1-2	Irr	Het	0	0	1
Grupo 17 (3)	Nif H	R	Ác	>2	Irr	Het	0	0	3
Grupo 18 (3)	Nif H	R	Ác	<1	Irr	Het	0	2	1
Grupo 19 (2)	NifH /NodC	R	Ác	<1	Irr	Het	0	2	0
Grupo 20 (7)	Nif H	I	N	1-2	Irr	Hom	7	0	0
Grupo 21 (2)	Nif H	L	N	1-2	Irr	Hom	2	0	0
Grupo 22 (1)	Nif H	L	N	1-2	Irr	Het	1	0	0
Grupo 23 (1)	Nif H	R	N	1-2	Irr	Het	0	1	0

Conclusões

Entre os hospedeiros utilizados, a jurema apresenta maior potencial para ser utilizada como planta-isca em solos de Caatinga, pois consegue obter maior número de isolados, riqueza e diversidade de rizóbios.

REFERÊNCIAS

- CORREIA, K.G., SANTOS, T.S., ARAUJO, K.D., SOUTO, J.S., FERNANDES, P.D. 2009. Atividade microbiana do solo em quatro estágios sucessionais da Caatinga no município de Santa Terezinha, Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v.6, n.3, p.534-549
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).
- FERNANDES 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, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 158).
- FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1-9, 2001.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da caatinga**, Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. 822 p.

SAMPAIO, E. V. S. B. **Overview of the Brazilian caatinga**. In: S. H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.). *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995. p. 35-63.

SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 467 p.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).