

Caracterização morfológica de isolados de rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivado em cinco diferentes solos do Semi-Árido pernambucano

Morphological characterization of rhizobium isolates from cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) grown in five different soils of the semi-arid of Pernambuco State

Marcionila Gonçalves Malheiro¹; Michelly Élen Leal Menezes¹; Polyane de Sá Santos²; Adriana Carla Ribeiro Lopes Pereira³; Carlos Alberto Tuão Gava⁴; Lindete Miriam Vieira Martins⁵

Resumo

Pesquisas sobre a diversidade microbiológica em solos do Semi-Árido envolvem busca por genótipos tolerantes aos diferentes estresses ambientais regionais. Dados referentes às características morfológicas de bactérias fornecem informações quanto à diversidade genotípica e são importantes para sua identificação e agrupamento. Este trabalho objetivou caracterizar rizóbios provenientes de solos do Semi-árido pernambucano sob diferentes manejos, utilizando caupi como planta-isca. Os testes foram efetuados em meio YMA, avaliando-se características culturais com mudança de pH do meio, tempo de crescimento, cor e tamanho das colônias, bem como produção de

¹Bióloga, Bolsista da Embrapa Semi-Árido/CNPq, C. P. 23, CEP 56302-970 Petrolina-PE, ²Mestranda FCAV/UNESP; ³Bolsista da Embrapa Semi-Árido/DTI; ⁴Pesquisadora da Embrapa Semi-Árido. ⁵UNEB, Juazeiro-BA. gava@cpatsa.embrapa.br.

exopolissacarídeo (muco). Trezentos e setenta isolados obtidos dos nódulos das plantas foram separados em 32 grupos morfológicos com similaridade superior a 80%. Entre estes, nove grupos, com um total de 165 isolados (44,6%), foram formados por bactérias de crescimento rápido (1 a 3 dias), todas produtoras de exopolissacarídeo. Quatorze grupos, com um total de 109 isolados (29,5%), apresentaram crescimento intermediário (4 a 5 dias) e nove grupos, com um total de 96 isolados (25,9%), apresentaram crescimento lento (acima de 6 dias). Os resultados indicam uma grande diversidade de rizóbios nativos que deverão ser estudados quanto à tolerância a estresses ambientais. Palavras chave: diversidade morfológica, feijão caupi, fixação biológica de nitrogênio, rizóbio.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) é uma das leguminosas mais adaptadas às condições brasileiras de clima e solo, sendo bastante cultivada para alimentação humana e animal nas regiões norte e nordeste. Pela sua rusticidade e capacidade de desenvolvimento em condições adversas e em função da sua habilidade em obter o nitrogênio necessário a seu desenvolvimento através do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, pela simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, apresenta considerável importância agrícola no Brasil (Freire Filho et al, 2005).

No entanto, fatores como temperatura, disponibilidade de água, salinidade do solo, entre outros estresses decorrentes dos fatores edafoclimáticos das regiões semi-áridas, influenciam a eficiência da simbiose sendo, em muitos casos, fatores limitantes para determinadas estirpes bacterianas (Nóbrega, 2004).

Devido à existência de uma grande diversidade de espécies nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio, com diferentes graus de eficiência, se faz necessário a obtenção de estirpes de rizóbio de alto desempenho, capazes de sobreviver e competir pela fixação eficiente do nitrogênio atmosférico na leguminosa alvo. Este trabalho teve por objetivo caracterizar diferentes isolados de rizóbio que nodulam em feijão-caupi, provenientes de solos sob diferentes manejos localizados no município de Petrolina (PE).

Material e Métodos

As amostras de solo foram coletadas em cinco áreas com diferentes históricos de manejo no município de Petrolina-PE. As coletas foram realizadas de 0-20 cm de profundidade e cada amostra composta foi constituída de pelo menos sete sub-amostras. Para capturar os rizóbios presentes nas amostras de solo foi realizado um experimento em casa de vegetação com delineamento de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo os solos de diferentes origens as parcelas e sub-parcelas os cinco cultivares testados, com três repetições para cada amostra. Em vasos de 3kg foram semeadas 4 sementes da planta isca e após 40 dia da semeadura as plantas foram coletadas para retirada dos nódulos formados. Após a remoção, os nódulos foram transferidos para frascos de vidro com sílica gel, para secagem e armazenamento.

A seguir, foi realizado o isolamento de cerca de 5% dos nódulos obtidos em plantas cultivadas nos solos de diferentes origens. Inicialmente os nódulos foram reidratados e desinfestados superficialmente em álcool 90% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 5% por um minuto, seguindo-se 10 lavagens com água esterilizada. Em seguida os nódulos foram pressionados com o auxílio de uma pinça em placa de Petri contendo o meio YMA + azul de bromotimol 0,5% (Fred & Waksman, 1928) e as placas foram incubadas a 28°C. Nesta etapa, o aparecimento das colônias nas placas foi observado do primeiro ao décimo segundo dia, após a repicagem. Ao mesmo tempo as estirpes eram isoladas em placas contendo vermelho congo para identificação de colônias de rizóbio.

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada segundo Vincent (1970), avaliando-se o tempo de crescimento de cada um dos isolados, alteração do pH do meio, diâmetro, forma e transparência das colônias. Quanto ao muco produzido, foram avaliados os aspectos de quantidade, elasticidade e aparência. Após a caracterização e purificação as estirpes foram estocadas em microtubos de ensaio (Eppendorf) contendo glicerina.

O agrupamento morfológico foi realizado utilizando o índice de similaridade SM que atribui pesos iguais tanto à presença quanto à ausência de determinada característica e um dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA onde se calculou uma matriz de similaridade (ROHLF, 1992).

Resultados e Discussão

Entre as 370 bactérias estudadas foram identificados trinta e dois grupos morfológicos, com similaridade superior a 80%. Entre estes, nove grupos, com um total de 165 isolados, foram formados por bactérias de crescimento rápido (1 a 3 dias) representando 44,6% dos isolados obtidos, todas produtoras de exopolissacarídeo. Quatorze grupos, com um total de 109 isolados, apresentaram crescimento intermediário (4 a 5 dias) formando um total de 29,5% dos isolados. Nove grupos, com um total de 96 isolados, apresentaram crescimento lento (acima de 6 dias), perfazendo 25,9% do total de isolados de rizóbio obtidos.

Os dados do agrupamento morfológico foram utilizados para calcular os índices de diversidade de Shannon-weaver, abundância de Simpsons e riqueza de Margalef e Menhinik (Odum). Destes, 32 grupos com características morfológicas diferentes, 73% apresentaram crescimento satisfatório em meio de cultivo, provocando acidificação do meio, 16% com bom desenvolvimento em pH neutro e 11% promoveram alcalinização do meio de cultura.

A caracterização dos isolados que nodulam caupi, de acordo com a morfologia das colônias permitiu encontrar diferenças significativas que foram utilizadas para o agrupamento dos mesmos. No grupo de crescimento rápido foram evidenciados alguns isolados que se destacaram dos demais por apresentar crescimento evidente em meio de cultivo em período menor que 24 horas.

Tabela 1 - Índices de diversidade estimados para isolados de bactérias Rhizobiáceas isoladas de nódulos de cinco cultivares de feijão-caupi cultivadas em cinco solos sob diferentes formas de manejo no semi-árido do Vale do São Francisco.

Solo	Índices					
	Shannon	s-1	Margalef	Menhinich	Riqueza	Simpson
S1 - chapada com caupi	3,68	18	4,17	2,19	9,6	0,11
S2 - caatinga nativa	2,17	5	1,16	0,69	2,67	0,25
S3 - baixio com caupi	2,17	6	1,39	0,81	3,2	0,32
S4 - plantio consorcio caupi/sorgo	2,7	9	2,08	1,15	4,8	0,21
S5 - caatinga nativa	3,28	11	2,59	1,43	5,96	0,13
CULTIVAR						
1-IPA 206	3,43	12	2,78	1,5	6,4	0,11
2-Macataú	2,82	10	2,32	1,27	5,33	0,21
3-Pujante	3,06	12	2,78	1,5	6,4	0,15
4-Canapu Tardio	3,48	13	3,01	1,62	6,93	0,11
5-BR17 Gurgueia	3,33	12	2,82	1,55	6,5	0,11

As bactérias que nodulam feijão-caupi tem sido consideradas rotineiramente como pertencentes à espécie *Bradyrhizobium* spp. que compreende um número grande de estirpes de crescimento lento capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas herbáceas. Entretanto, dentre os isolados obtidos dos solos estudados, o maior número de isolados obtidos apresentou crescimento rápido, acidificando o meio de cultura. Estes resultados diferem daqueles encontrados por Martins (1997) em solos de outras áreas na região. Segundo os autores, os isolados de rizóbio obtidos apresentaram crescimento lento com alcalinização do meio. Estes resultados sugerem que a diversidade morfológica das colônias é uma indicação das diferenças fundamentais entre isolados e pode ser um indício da diversidade genética dessas bactérias nos solos do semi-árido.

Referências Bibliográficas

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. O. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.

MARTINS, L. V. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brasil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p.1005-1010, 1997.

NOBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 269-279, mar./abr.2004.

ROHLF, J. F. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York : Applied Biostatistics, 1992. Np.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164 p. il.