

Diversidade Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Associadas à Gramínea Tolerante à Dessecação *Tripogon spicatus* na Caatinga

*Paulo Ivan Fernandes Júnior*¹; *Saulo de Tarso Aidar*¹; *Carolina Vianna Morgante*¹; *Carlos Alberto Tuão Gava*¹; *Jerri Édson Zilli*²; *Lindete Míria Vieira Martins*³

Resumo

As bactérias diazotróficas desempenham importante papel na nutrição vegetal em ambientes naturais e em agroecossistemas. A comunidade diazotrófica associada a espécies de não leguminosas cultivadas é bastante estudada, porém, há poucas informações a respeito da diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas silvestres. O objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a diversidade fenotípica de bactérias associadas à *Tripogon spicatus* na Caatinga. Foram coletadas plantas em uma área de Caatinga no Município de Lagoa Grande, PE. O solo rizosférico foi separado das raízes para a obtenção de bactérias do sistema radicular e do solo aderido. As amostras foram trituradas em solução salina, diluídas e inoculadas em meio de cultura semissólido, incubadas e após o crescimento, as bactérias foram purificadas em meio sólido e avaliadas quanto a suas características culturais, havendo posteriormente a confirmação da capacidade diazotrófica em meio semissólido. Foram obtidos 141 isolados bacterianos dos quais 67 apresentaram a capacidade diazotrófica. A maioria dos isolados (40) foram oriundos do sistema radicular de *T. spicatus*, enquanto a menor quantidade de isolados (27) foi oriunda do solo rizosférico. Poucos isolados apresentaram similaridade com as estirpes de referência utilizadas para comparação. Outros estudos estão sendo conduzidos para avaliar a diversidade taxonômica desses isolados.

Palavras-chave: biodiversidade, fixação biológica do nitrogênio, bactérias associativas, bactérias endofíticas.

Introdução

A Caatinga é um bioma tipicamente brasileiro que apresenta elevadas temperaturas médias e reduzida pluviosidade, sendo esta concentrada nos primeiros meses do ano. Diversas das espécies vegetais da Caatinga apresentam mecanismos de tolerância à seca como adaptação às condições de disponibilidade hídrica da região. *Tripogon spicatus* (Nees) Ekman, é uma gramínea (Poaceae) que apresenta a capacidade de tolerar longos períodos de seca por possuir mecanismos de acúmulo de osmoprotetores nos protoplastos celulares (GAFF, 1987; GAFF; LATZ, 1978). Esta espécie apresenta ampla distribuição no

¹ Pesquisador (a) da Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Petrolina, PE, CEP: 56320-970, paulo.ivan@cpatsa.embrapa.br.

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

³ Professora Adjunta da Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologias e Ciências Sociais, Juazeiro, BA.

Novo Mundo ocorrendo principalmente em encostas e em áreas arenosas ou com solos rasos como Neossolos Litólicos (BARKWORTH et al., 2007).

Além dos mecanismos fisiológicos, outros fatores podem influenciar na capacidade de tolerância à seca de espécies vegetais, por exemplo, a associação com micro-organismos pode reduzir os estresses causados pelos fatores ambientais como a seca e a escassez de nutrientes (PUENTE et al., 2009). *Tripogon* spp. ainda não foi avaliada com relação à capacidade de se associar a bactérias diazotróficas, porém, a sua capacidade de estabelecer associações com micro-organismos que atuam na redução da influência dos estresses ambientais no hospedeiro, como os fungos micorrízicos e fungos endofíticos "dark septate", já foi demonstrada (SATHIYADASH et al., 2010). Na Caatinga, plantas sadias de *T. spicatus* são abundantes em substratos oligotróficos sugerindo a existência de bactérias fixadoras de nitrogênio e outros microrganismos auxiliando no estabelecimento do vegetal.

Dentre os microrganismos que atuam na redução dos estresses ambientais sobre as plantas hospedeiras, as bactérias diazotróficas são um dos grupos mais bem estudados. No Brasil, há muitos estudos avaliando a ocorrência, diversidade e eficiência de diazotróficos associados a gramíneas e outras espécies de não leguminosas cultivadas (BALDANI; BALDANI, 2005). Entretanto, a associação de espécies vegetais nativas com bactérias diazotróficas ainda é pouco explorada. Resultados obtidos a partir de avaliações na Amazônia (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010) e no Pantanal (BRASIL et al., 2005) têm demonstrado que gramíneas nativas podem se associar a uma comunidade bacteriana diazotrófica bastante diversa, com baixa similaridade com estirpes de gêneros bem caracterizados como *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, por exemplo. Não há relatos da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a espécies de gramíneas nativas na Caatinga.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas associadas a *T. spicatus* em área de Caatinga.

Material e Métodos

No mês de maio de 2011 foram coletadas plantas sadias de *Tripogon spicatus* em quatro pontos (ponto 1: 8° 48' 23,9" S 40° 14' 58,7" W; ponto 2: 8° 48' 22,0" S 40° 14' 56,4" W; ponto 3: 8° 48' 16,4" S 40° 14' 54,4" W; ponto 4: 8° 48' 11,6" S 40° 14' 48,4" W) de uma área de Caatinga Hiperxerófila no Município de Lagoa Grande, PE. Em cada ponto de amostragem foi coletada uma amostra composta por ao menos cinco amostras simples (1 planta e o respectivo solo rizosférico). As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido e armazenadas em condições refrigeradas até o processamento do material.

Para o isolamento e purificação das bactérias diazotróficas foi realizado o procedimento proposto por Döbereiner et al. (1995), descrito brevemente a seguir. O solo rizosférico foi cuidadosamente separado das raízes e as plantas foram lavadas em água corrente, sendo posteriormente lavadas com água destilada autoclavada. Foram pesadas em triplicata 10 g de cada amostra de raiz ou de solo rizosférico, que foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% em miniprocessador. As suspensões foram deixadas em repouso por 1 hora e foram diluídas seriadamente até a diluição 10^{-7} . Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi inoculada em triplicata no meio de tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura BMGM semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) e incubadas por 7 dias a 30 °C. Em cada uma das diluições seriadas, as três

diluições menos concentradas que apresentaram formação de película característica da fixação biológica do nitrogênio em condições microaerófilas foram inoculadas novamente no meio semissólido e incubadas por 7 dias a 30 °C. As repetições que apresentaram novamente a formação de película foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Dyg's sólido e incubadas a 30 °C por 3 dias. As bactérias foram purificadas em meio Dyg's e após obtenção das culturas puras, reinoculadas em duplicata no meio BMGM semissólido para a confirmação da capacidade de fixação do nitrogênio em condições microaerófilas.

Todos os isolados bacterianos foram avaliados de acordo com as suas principais características culturais, sendo avaliado o tamanho e cor da colônia, a produção e a transparência do muco (SILVA; MELLONI, 2011). Para os isolados cuja formação de película no meio BMGM foi confirmada, os dados das características fenotípicas foram tabulados em uma planilha binária e um dendrograma de similaridade foi elaborado com o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o coeficiente de Dice, utilizando-se o programa PaSt (HAMMER et al., 2001). Para a elaboração do dendrograma de similaridade, além das bactérias diazotróficas isoladas neste estudo, foram incluídas as estirpes tipo das espécies *Azospirillum brasilense* (BR 11001), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11192), *Burkholderia tropica* (BR 11364) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284). Essas estirpes foram obtidas da coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

Para os isolados com 100% de similaridade em ambas as regiões de origem (solos rizosférico ou raiz) foram calculados os índices de diversidade (Shannon-Weaver), de dominância (Simpson) e de equitabilidade (Margalef). Esses índices foram comparados por meio do teste t (HUTCHESON, 1970).

Resultados e Discussão

Foram isoladas 141 bactérias, sendo 74 isolados oriundos de raízes de *T. spicatus* e 67 isolados oriundo do solo rizosférico. Dentre as 141 bactérias isoladas, 67 apresentaram a capacidade de formar a película em meio semissólido, indicando a capacidade de fixar N₂ em condições microaerófilas. Dentre as bactérias diazotróficas, 40 foram originárias de raízes e 27 oriundas de solo rizosférico (Tabela 1). No dendrograma de similaridade é possível observar a formação de 24 grupos fenotípicos, dos quais um foi formado exclusivamente pelas estirpes BR 11001 e BR 11192 (Figura 1). Três isolados oriundos do solo rizosférico apresentam 100% de similaridade com a estirpe BR 11284 de *G. diazotrophicus* (Figura 1).

Avaliando-se a diversidade dos isolados, o índice de Shannon-Weaver apresentou valores de 2,25 e 2,60 para as bactérias diazotróficas oriundas de raiz e de solo rizosférico, respectivamente. Os índices de Margalef e de Simpson para as bactérias do solo foram de 4,55 e 0,91, respectivamente, enquanto para as bactérias oriundas do sistema radicular apresentaram valores de 3,25 e 0,86, respectivamente (Tabela 1). Não foi observada diferença estatística entre a diversidade (Shannon-Weaver) e a dominância (Simpson) entre os grupos fenotípicos do solo e do sistema radicular de *T. spicatus*. Porém, o índice de equitabilidade de Margalef demonstrou haver distribuição mais homogênea entre os grupos fenotípicos do solo em relação à comunidade diazotrófica presente em raízes de *T. spicatus* (Tabela 1). A presença de grupos fenotípicos contendo, predominantemente, isolados oriundos de raízes ou de solo, além da diferença na distribuição das populações, indicam haver diferenças entre a estrutura das comunidades diazotróficas associadas a raízes ou a solo rizosférico de *T. spicatus*.

Tabela 1. Caracterização e diversidade fenotípica de isolados diazotróficos associados a *T. spicatus* na Caatinga.

Grupo fenotípico	N° de isolados	Origem		Características Fenotípicas*
		Raiz	Solo	
1	14	9	5	3; 2; 2; 1
2	1	1	-	2; 3; 2; 1
3	2	2	-	3; 3; 2; 1
4	2	-	2	3, 2, 3, 1
5	4	4	-	3; 2; 1; 2
6	10	8	2	3; 2; 1; 1
7	4	3	1	4; 2; 1; 1
8	3	2	1	4; 2; 2; 1
9	3	-	3	2; 2; 3; 1
10	3	-	3	2; 2; 1; 1
11	1	1	-	2; 2; 2; 1
12	1	-	1	2; 1; 2; 1
13	1	1	-	3; 1; 3; 4
14	2	1	1	3; 1; 2; 4
15	6	5	1	3; 1; 2; 1
16	1	1	-	1; 1; 1; 1
17	2	-	2	1; 2; 1; 1
18	1	-	1	1; 2; 1; 2
19	3	2	1	3; 2; 1; 2
20	1	-	1	3; 3; 1; 3
21	1	-	1	2; 3; 2; 2
22	1	-	1	2; 3; 1; 2
Total	67	40	27	
Índices Ecológicos				
Shannon-Weaver	2,25 ^{ns}	2,60	ns= não significitivo	
Margalef	3,25 ^{**}	4,55	^{**} significativo (p<0,15)	
Simpson	0,86 ^{ns}	0,91		

*1° valor:=cor: 1=amarela; 2= bege, 3=creme, 4= laranja; 2° valor= tamanho: 1= <1 mm, 2=1-3 mm; 3= >3 mm; 3° valor: transparência: 1= opaca, 2= translúcida, 3=transparante; 4° valor: produção de muco: 1= pouca, 2= mediana, 3= abundante, 4=colônia seca.

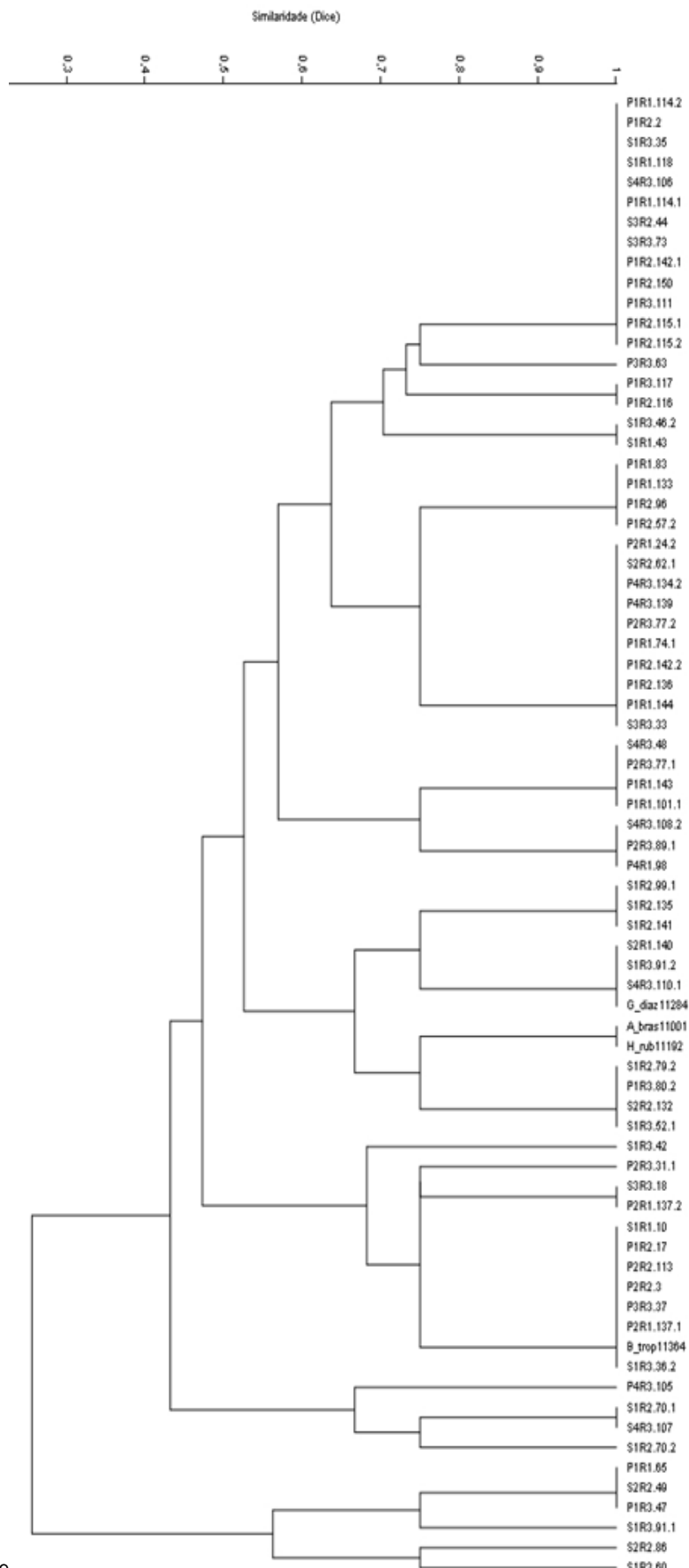


Figura 1. Dendrograma de nas características isolados de bactérias de raízes e de solo rizosférico de *T. spicatus* na Caatinga (método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Dice).

similaridade baseado fenotípicas de 67 diazotróficas oriundas (método de agrupamento UPGMA e coeficiente de similaridade de Dice).

Avaliando-se a diversidade dos isolados, o índice de Shannon-Weaver apresentou valores de 2,25 e 2,60 para as bactérias diazotróficas oriundas de raiz e de solo rizosférico, respectivamente. Os índices de Margalef e de Simpson para as bactérias do solo foram de 4,55 e 0,91, respectivamente, enquanto para as bactérias oriundas do sistema radicular apresentaram valores de 3,25 e 0,86, respectivamente (Tabela 1). Não foi observada diferença estatística entre a diversidade (Shannon-Weaver) e a dominância (Simpson) entre os grupos fenotípicos do solo e do sistema radicular de *T. spicatus*. Porém, o índice de equitabilidade de Margalef demonstrou haver distribuição mais homogênea entre os grupos fenotípicos do solo em relação à comunidade diazotrófica presente em raízes de *T. spicatus* (Tabela 1). A presença de grupos fenotípicos contendo, predominantemente, isolados oriundos de raízes ou de solo, além da diferença na distribuição das populações, indicam haver diferenças entre a estrutura das comunidades diazotróficas associadas a raízes ou a solo rizosférico de *T. spicatus*.

Diferenças nas comunidades microbianas associadas a raízes e solo rizosférico de gramíneas já foram observadas para espécies cultivadas (COELHO et al., 2009) e espécies de gramíneas silvestres (FERRERO et al., 2010). A maior quantidade de isolados bacterianos distintos presente no sistema radicular de *T. spicatus* pode indicar a existência de uma comunidade microbiana endofítica e epifítica bastante diversa. As bactérias presentes no solo rizosférico estão mais susceptíveis às condições adversas do ambiente o que colabora para a redução da quantidade de diferentes bactérias ocupando este nicho em determinadas situações. Porém, a rizosfera pode apresentar uma quantidade muito grande de micro-organismos diazotróficos e com elevada eficiência, como já demonstrado para diferentes genótipos de gramíneas cultivadas como o sorgo, por exemplo (COELHO et al., 2009).

A abundância de bactérias diazotróficas associadas a *T. spicatus* sugere que os micro-organismos isolados no presente estudo desempenham papel importante no estabelecimento dessa gramínea nas condições da Caatinga. Em condições ambientais áridas ou semiáridas, bactérias diazotróficas podem desempenhar um papel importante no estabelecimento de espécies de cactos (FUENTES et al., 2009) e de gramíneas (FERRERO et al., 2010). Bactérias isoladas de *Oryza glumaepatula*, em outros ambientes oligotróficos da América do Sul, podem promover o crescimento do hospedeiro original e de *Oryza sativa*, em condições de casa de vegetação, sugerindo que esses isolados influenciam no estabelecimento do hospedeiro original (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010).

Por causa das condições encontradas no Bioma Caatinga, a abundância e a elevada diversidade de bactérias diazotróficas associadas a *T. spicatus* indica um papel ecológico dos micro-organismos facilitando o estabelecimento e desenvolvimento do hospedeiro original. Estudos de caracterização polifásica estão sendo conduzidos com o intuito de entender a diversidade taxonômica desses isolados, bem como avaliar o potencial biotecnológico dessas bactérias.

Conclusões

Nas condições da Caatinga, *Tripogon spicatus* estabelece associações com uma comunidade diazotrófica bastante diversa.

Há diferença na estrutura das comunidades de bactérias diazotróficas associadas a raízes de ou em solo rizosférico de *T. spicatus*.

Agradecimentos

Ao Probio II pelo apoio financeiro.

Referências

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BARKWORTH, M. E.; ANDERTON, L.; CAPÉIS, K.; LONG, S.; PIEP, M. **Manual of Grasses for North America**. Longan: Utah State University Press, 2007. 543 p.
- BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, p. 179-190, 2005.
- COELHO, M. R. R.; MARRIEL, I. E.; JENKINS, S. N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A. G. Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 42:, p. 8-53, 2009.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 67, p. 2.790-2.798, 2001.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PERIN, L.; PEREIRA, G. M. D.; PASSOS, S. R.; ZILLI, J. E. Diversidade de bactérias promotoras de crescimento associadas à *Oryza Glumaepatula* Steud. no Estado de Roraima. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: anais**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. 1 CD-ROM,
- FERRERO, M.A.; MENOYO, E.; LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; FARÍAS, M.E.; SIÑERIZ, F. Molecular characterization and in situ detection of bacterial communities associated with rhizosphere soil of high altitude native Poaceae from the Andean Puna region. **Journal of Airid Environments**, New York, v. 74, p. 1.177-1.185, 2010.
- GAFF, D. F.; LATZ, P. K. The occurrence of resurrection plants in the Australian flora. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 26, p. 485-492, 1978.
- GAFF, D. F. Desiccation tolerant plants in South America. **Oecologia**. Heidelberg, v. 74, p.133-136, 1987.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, [Boulder], v .4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HUTCHESON, K. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 29, p. 151-154, 1970.
- PUENTE, M.E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 66, p. 402-408. 2009.
- SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.; UMA, E. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian grasses. **Symbiosis**, n. 52, p. 21-32, 2010.
- SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, p. 359-371, 2011.