

Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com *Macroptilium lathyroides*(L.) Urb. em Roraima⁽¹⁾.

Joselma Pedrosa da Silva⁽²⁾; Vicente Gianlupi⁽³⁾; Krisle da Silva⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos de Embrapa Projeto Coleções D & M: 01.09.01.003.02.07.

⁽²⁾ Aluna de graduação em Ciências Biológicas; Faculdade Cathedral; Boa Vista-RR; biojoselmalogia@yahoo.com.br;

⁽³⁾ Eng^o Agrônomo, Pesquisador, EMBRAPA - Roraima, Br.174 Km 8, Distrito Industrial, Boa Vista, RR;

⁽⁴⁾ Pesquisadora, Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR; krisle.silva@embrapa.br.

RESUMO: Devido às características de adaptabilidade a diferentes ambientes e ao curto ciclo reprodutivo com facilidade de produção de sementes, o feijão-dos-arrozais (*Macroptilium lathyroides*), constitui uma planta de interesse agrônomo. Esta planta foi recentemente encontrada em áreas agrícolas em Roraima e tem potencial como forrageira, pois esta leguminosa estabelece simbiose com bactérias fixadora de nitrogênio. Portanto, o objetivo deste estudo foi isolar e avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com *Macroptilium lathyroides*(L.) Urb. As bactérias foram isoladas de nódulos das raízes de plantas coletadas em uma propriedade agrícola no município de Bonfim-RR. Cem nódulos de três plantas foram escolhidos ao acaso, e isoladas em meio YMA com vermelho congo. Após isolamento as bactérias foram caracterizadas quanto à morfo-fisiologia das colônias em meio de cultivo YMA contendo azul de bromotimol. Dos 100 nódulos escolhidos, foi possível isolar 129 bactérias. A maioria das bactérias apresentou crescimento muito rápido e acidificação do meio de cultura. O resultado do dendrograma revelou uma elevada diversidade, sendo formados 53 grupos com 70% de similaridade. As 129 bactérias isoladas de *M. lathyroides* apresentaram elevada diversidade morfo-fisiológica, sendo promissoras para a fixação biológica de nitrogênio.

Termos de indexação: Fixação biológica de nitrogênio; Feijão-dos-arrozais; Amazônia

INTRODUÇÃO

O gênero *Macroptilium* engloba aproximadamente 20 espécies, sendo um dos mais conhecidos na subtribo Phaseolinae (Delgado-Salinas & Lewis, 2008). Dentre as espécies com uso econômico, se destacam *Macroptilium atropurpureum* e *M. lathyroides* que são

utilizadas como plantas forrageiras (Monkset al., 2006; Guerra et al., 2007; Vasconcelos et al., 2011). *M. lathyroides* é conhecido por diferentes nomes: figo-de-pombo (Vasconcelos et al., 2011), feijão-dos-arrozais (Ferreira et al., 2004) ou feijão-de-rôla (Basile et al., 2007). O feijão-dos-arrozais, particularmente, apresenta características apropriadas para solos úmidos, podendo alcançar altos rendimentos de forragem de qualidade. Pouco exigente em fertilidade, vegeta em locais mal drenados e com pH baixo, além de ser adaptada a precipitações pluviais anuais de 630 a 1800 mm (Monks et al., 2006; Vasconcelos et al., 2011).

Na safra de 2012/ 2013 em áreas agrícolas de Roraima, foi detectada a presença desta leguminosa. Esta planta é uma alternativa para a melhoria da qualidade das pastagens nas terras baixas do Rio Grande do Sul (Reis, 1988), e também pode ser uma alternativa para as áreas em Roraima desde que manejado corretamente.

Apesar de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, pouco se conhece sobre a diversidade destas bactérias. Assim, neste trabalho objetivou-se isolar e caracterizar fenotipicamente bactérias coletadas de nódulos de *Macroptilium lathyroides*(L.) Urb. em Roraima.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das bactérias

A coleta foi realizada em uma área de lavoura de soja em propriedade particular no Município de Bonfim, Roraima, que representa uma área de cerrado (N 03°14'56.3"W 060°16'28.9").

As raízes foram retiradas no campo com auxílio de pá reta. Estas foram acondicionadas em sacos e levadas ao laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Roraima, onde foram lavadas, os nódulos retirados e armazenados em frascos contendo sílica gel. A parte aérea de plantas contendo flores foi coletada para confecção de exsiccatas que foram depositadas no Herbário do Museu Integrado de Roraima, onde

foram identificadas botanicamente como *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. Foram coletadas amostras de três plantas.

Isolamento e purificação

Para o isolamento, 100 nódulos escolhidos ao acaso das três plantas, foram mantidos em água estéril por duas horas para reidratação. Posteriormente, procedeu-se a desinfestação com etanol 92,8% por três segundos, hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos e sucessivas lavagens em água estéril. Os nódulos desinfestados foram esmagados com pinça estéril e o líquido intranodular foi estriado utilizando alça de platina em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (Fred & Waskman, 1928) contendo o indicador vermelho congo a 0,25%. As placas foram incubadas a 28° C, com verificações diárias da formação de colônias. Após aparecimento das colônias, as mesmas foram repicadas para outra placa de Petri contendo meio de cultura YMA com indicador, azul de bromotimol (0,5%) e novamente incubadas para a purificação. As placas foram monitoradas diariamente visando verificar o surgimento de colônias isoladas para posterior caracterização fenotípica através da morfo-fisiologia de colônias.

Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica foi realizada através da morfo-fisiologia cultural das colônias. Para isto, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólida YMA (Fred & Waskman, 1928), contendo azul de bromotimol e incubadas a 28°C. A caracterização foi iniciada a partir do aparecimento das primeiras colônias isoladas. As características avaliadas foram: crescimento em dias (aparecimento de colônias isoladas), alteração do pH do meio (neutro, ácido e alcalino), diâmetro das colônias (mm), forma (puntiforme, circular ou irregular), elevação das colônias (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante), borda (inteira ou irregular), superfície da colônia (lisa ou rugosa), produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante), transparência (opaca, transparente e translúcida), muco (homogêneo ou heterogêneo). Devido às plantas se encontrarem em uma lavoura de soja, além das bactérias isoladas, foram incluídas na caracterização quatro estirpes referências para produção de inoculantes de soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*); SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*).

As características foram comparadas e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jaccard. Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA (averagelinkageclustering) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1t).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 nódulos submetidos ao isolamento, foram recuperadas 129 bactérias. Isto ocorreu devido à observação de duas morfologias bacterianas diferentes durante o processo de isolamento. O que indica a presença de mais de uma bactéria dentro dos nódulos.

Quanto à caracterização fenotípica, através da morfologia das colônias, verificou-se que a 79 bactérias apresentaram crescimento muito rápido 50 rápidos, não apresentando bactérias com crescimento intermediário e lento. Quanto à alteração do pH do meio, 52 bactérias apresentaram reação ácida; 30 neutra e 47 alcalina em meio YMA acrescido de azul de bromotimol (Figura 1).

Bactérias de crescimento intermediário a lento e reação neutra a alcalina são características típicas do gênero *Bradyrhizobium* (Moreira & Siqueira, 2006). Isto demonstra que entre as 129 bactérias isoladas, nenhuma apresentou essa característica. Quando foi gerado o dendrograma das bactérias isoladas de feijão-dos-arrozais juntamente com as estirpes referências (SEMIA 597, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080), foi possível observar uma elevada diversidade, sendo formados 53 grupos a 70% de similaridade (Figura 2). Também foi possível observar que nenhuma bactéria isolada foi semelhante às estirpes referência, indicando que apesar das plantas estarem presentes em área cultivada com soja, as estirpes recomendadas para produção de inoculantes (SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080) não estabeleceram simbiose com feijão-dos-arrozais. Os resultados deste trabalho indicam que apesar de *M. lathyroides* ter sido introduzido em Roraima, esta leguminosa foi capaz de estabelecer simbiose com bactérias nativas com elevada diversidade morfo-fisiológica, favorecendo o seu crescimento nestes solos.

CONCLUSÕES

As bactérias isoladas de *M. lathyroides* demonstraram uma elevada diversidade morfo-fisiológica cultural.

Apesar de terem sido isoladas em lavouras de soja, as bactérias obtidas não se foram similares as bactérias utilizadas em inoculantes de soja.

REFERÊNCIAS

BASILE, A. G. et al. Controle químico de feijão-de-rôla (*Macrotiumlathyroides*) com glyphosate. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu. Anais... Botucatu: FCA, UNESP, 2007. 1 CD-ROM.

DELGADO-SALINAS, A.; LEWIS, G. P. A new species of *Macrotium*(Benth.)Urb.(Leguminosae: Papilionoideae: Phaseolinae)from North-Eastern Brazil. **Kew Bulletin**,v.63, n.1, p.151-154, 2008. FONSECA, J. A. & MEURER, E. J. Inibição da absorção de magnésio pelo potássio em plântulas de milho em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 21:47-50, 1997.

FERREIRA, O. G. L. et al. Efeito do corte da parte aérea e de épocas de colheita sobre o rendimento e qualidade das sementes de feijão-dos-arrozais. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.10, n.2, p.175-178, 2004.

GUERRA, J.G.M. et al. Desempenho de leguminosas tropicais perenes como plantas de cobertura do solo. *Seropédica: EmbrapaAgrobiologia*, 2007. 22 p. (EmbrapaAgrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 20).

MONKS, P.L. et al. Produção e qualidade de sementes de *Macrotiumlathyroides*(L.). *Rev. Bras. Herb.*, v.11, n.1, p.11-23, jan./abr. 2012 Urb. sob diferentes espaçamentos e épocas de colheita. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.36, n.2, p.107-112, 2006.

VASCONCELOS, W. A. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de figo de pombo (*Macrotiumlathyroides*). *Revista Trópica*, v.5, n.1, p.3-11, 2011.

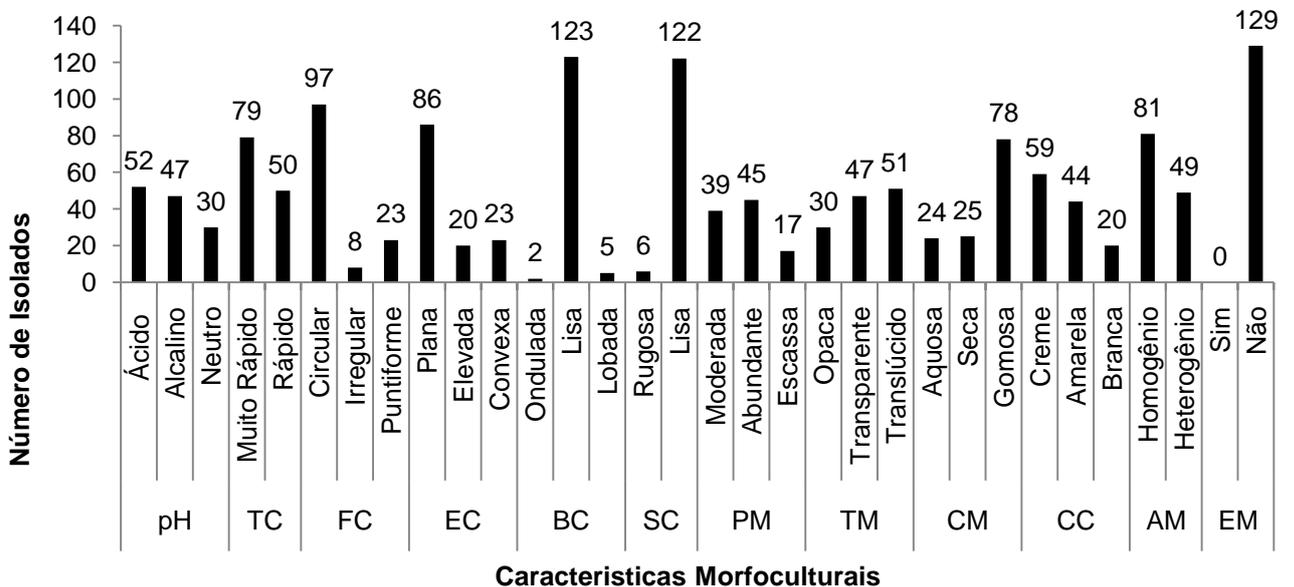


Gráfico 1. Características morfo-fisiológicas culturais das bactérias isoladas de feijão dos arrozais (*Macrotiumlathyroides*) coletadas em lavoura de soja em Roraima.

pH; TC (tempo de crescimento); FC (forma da colônia); EC (elevação da colônia); BC (borda da colônia); SC (superfície da colônia); PM (produção de muco); TM (transparência do muco); CM (consistência do muco); AM (aparência do muco); CC (cor da colônia) e EM (elasticidade do muco).

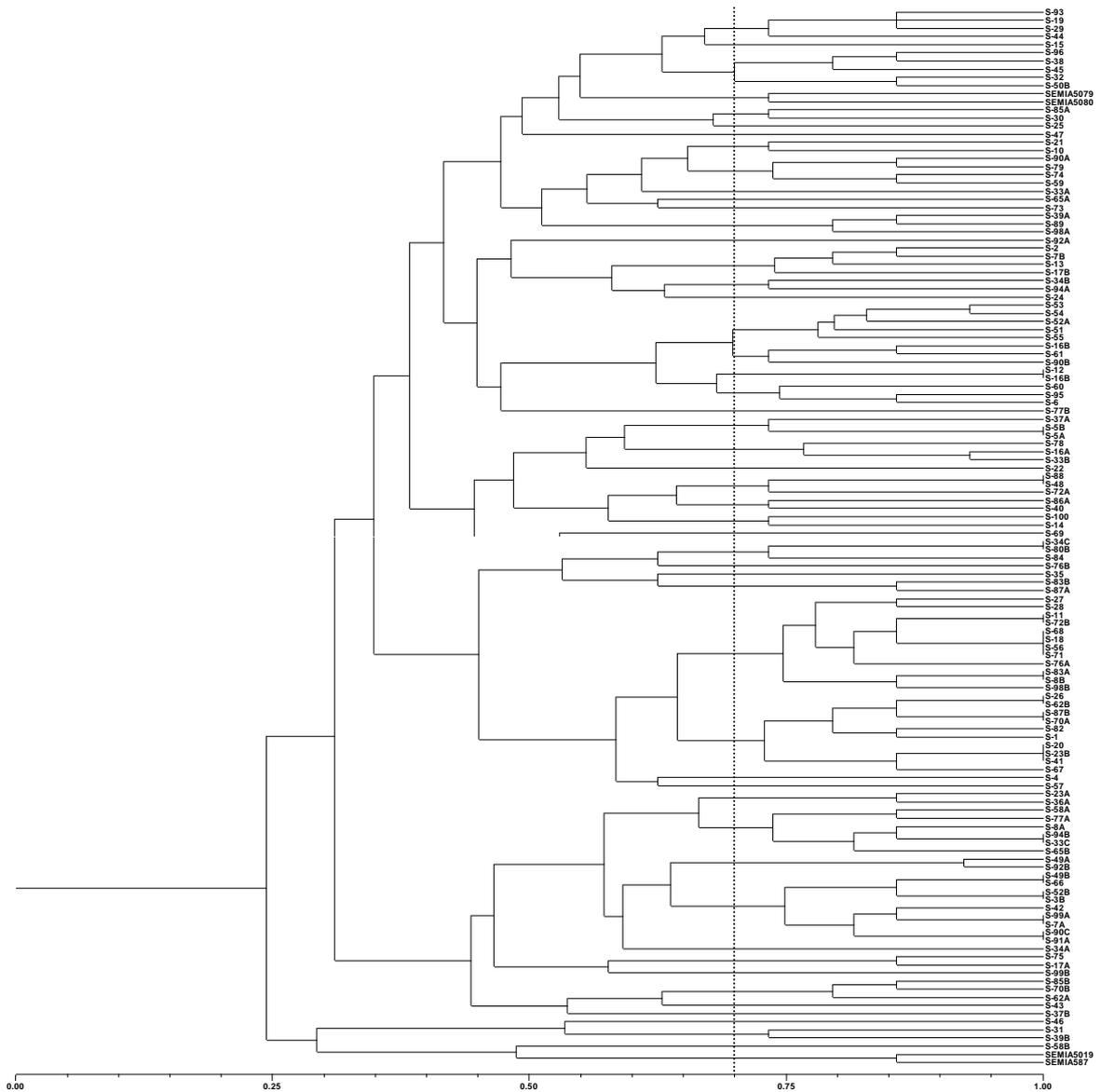


Figura 2 - Dendrograma de similaridade de bactérias isoladas de feijão-dos-arrozais (*Macroptilium lathyroides*) coletadas em área de cultivo de soja em Roraima.