



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO NA ESPÉCIE *Pterogyne nitens* Tull

Renata Soares dos Santos¹

Joilson Silva Ferreira²

Rafael Nogueira Scoriza³

RESUMO

A leguminosa *Pterogyne nitens* Tull. (Madeira Nova) pertencente à subfamília Caesalpinoideae é uma espécie de ampla distribuição, rusticidade e rapidez de crescimento, sendo estas características interessantes para sua utilização em recuperação de áreas degradadas. Quando em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, estas leguminosas são mais tolerantes às condições adversas. Com isso, o objetivo do trabalho é isolar e caracterizar estirpes de rizóbios na espécie *Pterogyne nitens* Tull. Para isso, foram coletadas amostras de solo em um plantio de Madeira Nova, colocados em 25 recipientes de 500 mL e, em cada um, duas sementes de Madeira Nova que passaram por escarificação mecânica. Após 120 dias do plantio, as raízes foram analisadas em relação à presença de nódulos e ao crescimento de rizóbios em meio de cultura 79, a partir do extrato das raízes. Além disso, foram cultivadas em meio de cultura as bactérias BR 3630, BR 6205, BR 6212 e BR 4406, adquiridas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, para fins de comparação. Não houve presença de nódulos nas raízes, mas a partir de seu extrato foi possível obter um isolado, com características semelhantes da estirpe *Mesorhizobium elkanii* (BR 3630) da Embrapa Agrobiologia.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio; madeira nova; bactérias diazotróficas

ABSTRACT

Isolation and characterization of strains of rhizobium species in *Pterogyne nitens* Tull. The legume *Pterogyne nitens* Tull. belonging to the subfamily *Caesalpinoideae* is a widely distributed species, hardiness and rapid growth, and these interesting characteristics for use in recovery of degraded areas. When in symbiosis with nitrogen fixing bacteria, these legumes are more tolerant to adverse conditions. Therefore, the objective of this work was isolate and to characterize strains of rhizobia in the specie *Pterogyne nitens* Tull. For this, Samples of soil from planting madeira nova were placed in 25 plastic pots of 500 mL. Then two mechanically scarified seeds were planted in each pot. After 120 days of the planting, the roots were analyzed for the presence of nodules and growth of rhizobia in culture medium 79. Moreover, were grown

¹ Curso de Engenharia Florestal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista – BA, Brasil.

² DFZ, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista, Brasil.

³ PPG em Agronomia - Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.
E-mail para correspondência: rafaelscoriza@gmail.com

in culture medium, bacteria BR 3630, BR 6205, BR 6212 and BR 4406, acquired from Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ, for comparison purposes. There were no nodules on the roots, but from extract of the roots was possible to obtain an isolate with characteristics similar strain *Mesorhizobium elkanii* (BR 3630) from Embrapa Agrobiologia.

Key words: nitrogen fixation biological; madeira nova; bacteria diazotrophs

INTRODUÇÃO

Pterogyne nitens Tull., conhecida popularmente como amendoim-bravo, madeira-nova e bálsamo, é uma espécie pertencente à família Fabaceae - subfamília Caesalpinoideae, ocorrendo naturalmente em solo de baixa fertilidade química, com textura desde arenosa até argilosa e em solos calcários (Carvalho, 2003) na Mata Atlântica, podendo ocorrer no Cerrado, na Caatinga, em áreas úmidas com vegetação florestal, e principalmente na floresta latifoliada semidecídua (Lorenzi, 2002) a uma altitude de 120 m no Mato Grosso do Sul e Mato Grosso e a 1.300 m na Bahia (Carvalho, 2003).

A árvore apresenta rusticidade e rapidez de crescimento, sendo considerada ótima para plantios mistos associados com espécies pioneiras para a recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2003). Também é recomendada para arborização urbana devido à sua folhagem brilhante, beleza e aroma das flores (Carvalho, 2003). De acordo com Bonfim *et al.* (2009), na região de Vitória da Conquista - BA, a utilização de uma espécie florestal adaptada às condições ambientais da região é de fundamental importância para programas de reflorestamento.

As leguminosas fixam nitrogênio através da simbiose com bactérias conhecidas por “rizóbio”, representada por 13 gêneros, sendo os principais *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium*, somando 98 espécies conhecidas (Weir, 2012). São importantes do ponto de vista econômico e ecológico, pois podem dispensar total ou parcialmente os fertilizantes nitrogenados, contribuindo assim para viabilizar reflorestamentos e minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes insumos (Barberi *et al.*, 1998; Moreira e Siqueira, 2008).

Além de serem capazes de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, as leguminosas arbóreas formam também simbioses com fungos micorrízicos (Nogueira *et al.*, 2012). Por apresentar um sistema radicular profundo e ramificado e uma grande produção de matéria orgânica, este grupo florístico influencia positivamente as propriedades do solo e seus processos químicos e biológicos (Bertoni e Lombardi Neto, 2008; Gei e Powers, 2013), fornecendo diferentes serviços ambientais (Duarte *et al.* 2013). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no período de agosto de 2011 a julho de 2012, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizada no município de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Inicial-

mente, buscou-se coletar nódulos em raízes de indivíduos de um plantio de Madeira Nova (*Pterogyne nitens* Tull.) com sete anos de idade, localizado no Campo Agropecuário da UESB, nas coordenadas 14° 88' 36,00 S e 40° 78' 92,00 W. A coleta foi baseada na metodologia que consiste em escavar ao redor do colo da planta, com o auxílio de uma pá, para localizar alguma raiz inserida no tronco principal, com cuidado e afofando-se o solo até visualizar as ramificações mais finas dessa raiz, onde normalmente ocorrem os nódulos (Moreira, 2010).

Também foi conduzido um ensaio, na mesma época, utilizando 10 amostras de solo coletadas aleatoriamente no plantio de Madeira Nova, na profundidade de 0-10 cm com o auxílio de uma pá, contendo aproximadamente 2 kg de solo cada. As amostras de solo foram misturadas e secas ao ar, em seguida, passadas em peneira com malhas de 2 cm e distribuídas em 25 copos descartáveis de 500 mL (Souza *et al.*, 2007). O solo foi classificado como Latossolo Amarelo distrófico, conforme Sistema Brasileiro de Classificação do Solo (Embrapa, 2006).

Em seguida, foram coletadas sementes de Madeira Nova em árvores localizadas na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) para realizar o plantio nos 25 copos descartáveis com solo. Foram plantadas em cada copo duas sementes, com 90 % de germinação, que passou por quebra de dormência (escarificação mecânica). Após a germinação, foram mantidas as duas plântulas por copo. O solo foi adubado 45 dias após o plantio com 100 mg.dm⁻³ de P, K e Ca, adicionando 50 mL de uma solução nutritiva com K₂HPO₄ e CaCl₂.

As mudas foram distribuídas aleatoriamente em bancada no laboratório, onde permaneceram por 60 dias após o plantio (DAP) e, depois, transferidas para casa de vegetação por mais 60 dias. O sistema radicular de todas as plantas foi coletado aos 120 DAP, para observação quanto à presença ou não de nódulos. O solo aderido às raízes foi retirado com cuidado, de modo a evitar a possível queda de nódulos (Barberi *et al.*, 1998).

Para o isolamento das bactérias, foram utilizadas as raízes de duas plantas com 120 DAP. Inicialmente, as raízes foram desinfetadas superficialmente e sequencialmente com álcool etílico a 70%, hipoclorito de sódio e água destilada, por um minuto cada. As raízes das duas plantas foram maceradas em cadinho com auxílio de um pistilo, ambos estelizados. O extrato obtido foi espalhado com a alça de platina em placa de petri contendo o meio 79 sólido com indicador azul de bromotimol (Fred e Waksman, 1928). Em seguida, as placas foram incubadas por 7 dias em BOD a 30°C. Todo o processo de isolamento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os isolados bacterianos obtidos foram transferidos para o meio 79 sólido com indicador vermelho congo, com o objetivo de verificar visualmente se o isolado era rizóbio ou contaminante. De modo geral, as colônias de estirpes de rizóbio, neste meio, apresentam coloração de branco a rosa e o contaminante apresenta coloração avermelhada. Em seguida, as estirpes obtidas foram repicadas em meio 79, com azul de bromotimol até obter colônias puras.

Na etapa seguinte, as colônias puras, dos isolados obtidos, foram caracterizadas em meio 79 com azul de bromotimol e as suas características comparadas com as de colônias das bactérias *Mesorhizobium elkanii* (BR 3630), *Bradyrhizobium elkanii* (BR 6205; BR 6212; BR 4406), adquiridas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. As características observadas foram a acidificação do meio, com base na modificação do pH e alteração da cor do meio, velocidade de crescimento, quantidade de muco produzido

e coloração da colônia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada a presença de nódulos na análise do sistema radicular de plantas com sete anos de idade, localizadas no campo Agropecuário da UESB e nem nas mudas de *Pterogyne nitens* cultivadas em casa de vegetação. Moreira e Siqueira (2008) verificaram que a maioria das espécies não nodulíferas são Caesalpinioideae, sendo que, neste grupo, 76% das espécies já examinadas são incapazes de estabelecer simbiose com rizóbio.

Faria *et al.* (1989), comparando a ocorrência da nodulação nas três sub-famílias de Fabaceae ocorrentes nas principais fitofisionomias do sudeste do Brasil, verificaram que somente 23% das espécies de Caesalpinioideae examinadas nodulavam, e este número era muito menor quando comparado aos 90% de nodulação verificados em Mimosoideae e 97% em Papilionoideae.

Segundo Moreira (1994), a ausência de nodulação em Caesalpinioideae pode estar relacionada ao fato desta subfamília conter gêneros de espécies arbóreas mais arcaicos na escala de evolução, e estes serem incapazes de nodular.

A partir do extrato da raiz das mudas de *Pterogyne nitens*, foi possível obter apenas um isolado de rizóbio. Segundo Fonseca (2010), a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma estratégia incomum em Caesalpinioideae, porém, novas informações de espécies arbóreas nodulíferas em leguminosas sugere que esta família apresenta ainda potencial de investigação nesta área (Faria *et al.*, 2010), como constatado por Lemos (2009), que, promovendo a prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento desta espécie, obteve sete isolados de bactérias rizosféricas e duas endofíticas (*Sphingomonas* sp., *Rhizobium tropici*, *Dyella* sp. e *Sphingobium chlorophenicum*).

A bactéria isolada apresentou crescimento rápido, acidificação do meio, muita quantidade de muco e coloração laranja (Figura 1). Estas mesmas características foram observadas na estirpe BR 3630 (*Mesorhizobium elkanii*), isolada da espécie *Acacia angutissima* (Figura 2).

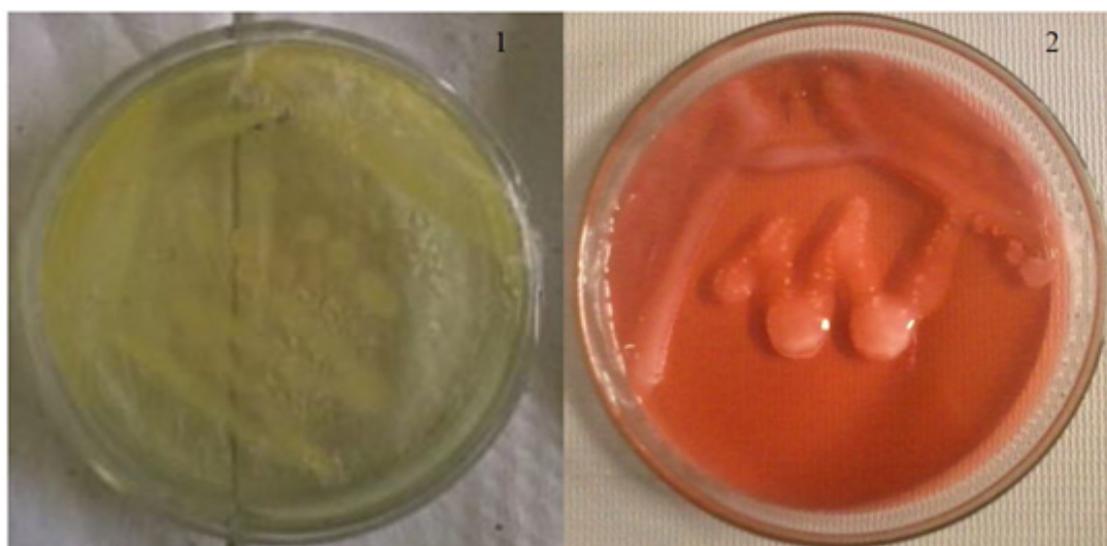


Figura 1. Bactéria isolada a partir da raiz de *Pterogyne nitens*. 1. Acidificação do meio e coloração (meio 79 com indicador azul bromotimol). 2. Quantidade de muco em meio 79 com indicador vermelho congo (Foto: Renata Soares dos Santos).



Figura 2. Isolado da Estirpe *Mesorhizobium elkanii* (BR 3630) em meio 79 com indicador azul bromotimol, apresentando acidificação do meio e muita quantidade de muco (Foto: Renata Soares dos Santos).

Isolados de *Anadenanthera peregrina*, *Albizia lebbbeck* e *Platyciamu regnelli* que apresentaram crescimento rápido, acidificação do meio, coloração creme e muita ou média quantidade de muco foram classificados por Barberi *et al.*, (1998) como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Mesorhizobium*. Além disso, Moreira (2010) enfatiza que *Mesorhizobium* apresenta as mesmas características de *Rhizobium*, podendo apresentar crescimento intermediário (4 a 5 dias), não sendo esta uma característica de todas as espécies.

CONCLUSÕES

Não foram observados nódulos visíveis na espécie estudada nas condições testadas. Considerando as características morfológicas, o isolado de raízes *Pterogyne nitens* apresentou semelhanças à estirpe BR 3630 da Embrapa Agrobiologia que pertence ao gênero *Mesorhizobium*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB), pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

- BARBERI, A. *et al.* 1998. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*, 4(1):145-153.
- BERTONI, J.; LOMBARDI NETO, F. 2008. **Conservação do Solo**. 7. ed. São Paulo: Editora Ícone, 355p.
- BONFIM, A. A. *et al.* 2009. Avaliação morfológica de mudas de madeira-nova (*Pterogyne nitens* Tull.)

produzidas em tubetes e sacos plásticos e de seu desempenho no campo. **Floresta**, **39**(1):33-40.

CARVALHO, P. E. R. 2003. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Florestas, 1039p.

DUARTE, E. M. G. *et al.* 2013. Decomposition and nutrient release in leaves of Atlantic Rainforest tree species used in agroforestry systems. **Agroforest Systems**, **28**:835-847.

EMBRAPA. 2006. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 306p.

FARIA, S. M. *et al.* 1989. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, **111**:607-619.

FARIA, S. M. *et al.* 2010. Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. **Journal of Experimental Botany**, **61**(11):3119-3127.

FONSECA, M. B. *et al.* 2010. Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. **Acta Botânica Brasilica**, **24**(2):322-327.

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

GEI, M. G.; POWERS, J. S. 2013. Do legumes and non-legumes tree species affect soil properties in unmanaged forest and plantations in Costa Rican dry forests? **Soil Biology & Biochemistry**, **57**:264-272.

LEMONS, M. T. O. 2009. **Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista - UEP, Jaboticabal – SP, 59p.

LORENZI, H. 2002. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 384p.

MOREIRA, F. M. S. 2010. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de Leguminosae. In: F. M. S. Moreira; E. J. Huising; D. E. Bignell. (Eds.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, p. 279-312.

MOREIRA, F. M. S. 1994. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: R. S. Araujo; M. Hungria. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, p. 121-150.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. 2008. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 729p.

NOGUEIRA, N. O. *et al.* 2012. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera**, **8**(14):2012-2031.

SOUZA, L. A. G. *et al.* 2007. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **42**(2):207-217.

WEIR, B. S. The current taxonomy of rhizobia. Disponível em: <<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>>. Acesso em: 16 abr. 2014.