

Diversidade morfológica de rizobactérias em nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina.⁽¹⁾

Silmar Primieri⁽²⁾; Bianca Salete Branco⁽³⁾; Murilo Dalla Costa⁽⁴⁾; Marcos Roberto Dobler Stroschein⁽⁵⁾, Julio Cesar Pires dos Santos⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do Edital n°12/2012, da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC).

⁽²⁾ Professor do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), campus Urupema/SC. E-mail: silmar.primieri@ifsc.edu.br;

⁽³⁾ Estudante do curso técnico de Biotecnologia, Instituto Federal de Santa Catarina, campus Lages/SC. ⁽⁴⁾ Pesquisador da EPAGRI, Estação Experimental de Lages/SC. ⁽⁵⁾ Coordenador de pesquisa do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC). ⁽⁶⁾ Professor da Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, campus Lages.

RESUMO: A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é um dos recursos florestais nativo do Sul do Brasil mais manejado por agricultores familiares do estado de Santa Catarina (SC). A espécie possui múltiplas utilidades e apresenta potencial econômico. O objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar, morfológicamente, as rizobactérias formadoras de nódulos ocorrentes em bracatinga em Santa Catarina. Nódulos foram coletados do sistema radicular da espécie em 61 locais, no estado de Santa Catarina e colônias bacterianas foram isoladas em meio LMA (Levedura Manitol Ágar). Após o crescimento, as colônias foram isoladas e posteriormente avaliadas morfológicamente. Foram obtidos um total de 295 isolados bacterianos de nódulos de bracatinga, formando 37 morfotipos. As características morfológicas predominantes foram: 94% apresentaram crescimento rápido; 66% com colônias menores que 1mm; 72% das colônias eram puntiformes e achatadas; 81% brancas e as demais roxas; 83% opacas; 81% acidificaram o meio e 76% produziram pouco muco. Os índices de Shannon e Margalef mostraram alta diversidade e riqueza de espécies que nodulam *M. Scabrella* e apresentaram diferenças entre as mesorregiões estudadas.

Palavra Chave: bracatinga; nódulos; Santa Catarina.

INTRODUÇÃO

Ao longo da história de ocupação do estado de Santa Catarina (SC), a Floresta Ombrófila Mista ou Mata de Araucária, principal bioma da serra catarinense, foi alvo de intensa exploração madeireira e uma grande mudança no uso do solo foi configurada; atualmente menos de 1% do total dessa floresta é remanescente. A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth., Fabaceae) é uma espécie componente dessa formação florestal; de porte arbóreo, ocorre em áreas de floresta secundária ou em regeneração (CARVALHO, 2002). Como pioneira, destaca-se por colonizar terrenos nus e degradados, fazendo parte de capoeiras, capoeirões e em formações mais homogêneas denominados de bracingais (CARVALHO, 2002).

Essa árvore é um dos recursos florestais nativos do Sul do Brasil mais manejado por agricultores familiares de Santa Catarina e tem múltiplas utilidades: na produção apícola de mel e melato, como espécie paisagística, na produção de celulose, na indústria madeireira, como palanques e escoras, na recuperação de áreas degradadas e como fonte de energia (EMBRAPA, 1988). Além disso, as folhas da bracatinga podem ter mais de 19% de proteína bruta e é consumida pelos ruminantes no período hibernar quando há restrição das pastagens (FREITAS et al., 1994).

A bracatinga, assim como outras espécies leguminosas, forma, nas raízes, associação simbiótica com bactérias diazotróficas, em estruturas denominadas de nódulos. Em troca de nutrientes e energia, as bactérias reduzem

nitrogênio atmosférico (N₂) a amônia (NH₃) que uma vez transferido aos tecidos vegetais pode ser metabolizado em aminoácidos e proteínas. Esse processo, denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), permite a reciclagem de um dos nutrientes mais importante para os seres vivos e promove diminuição e até supressão de aplicação de fertilizantes nitrogenados nos sistemas produtivos. Atualmente não existem estirpes bacterianas eficientes recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a inoculação em bracatinga (BRASIL, 2011).

O gênero *Mimosa* apresenta simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae, pertencente a classe α -proteobacteria. No entanto, estudos que realizaram o isolamento de bactérias em *Mimosa pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* e *M. scabrella* demonstraram que membros da classe β -proteobacteria podem ser isolados de nódulos destas plantas (CHEN et al., 2007; VANDAMME & COENYE, 2004). Esses resultados indicam que a diversidade de procariotos que realizam simbiose em leguminosas arbóreas pode ser muito mais ampla que o previsto e certamente conduzirão a avanços significativos no conhecimento da origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio (FBN), assim como sua manipulação pelo ser humano.

As características fenotípicas das espécies bacterianas capazes de formar nódulos em leguminosas fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. Esses estudos revelam a diversidade dos isolados e costumam estar relacionado com os estudos utilizando DNA genômico (MARTINS et al., 1997).

O objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar, morfológicamente, as rizobactérias nodulíferas ocorrentes em bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina.

METODOLOGIA

As amostras de nódulos foram coletadas no período de setembro de 2012 à abril de 2013, diretamente na rizosfera do sistema radicular de indivíduos de *Mimosa scabrella* em remanescentes florestais ao longo do estado de Santa Catarina, distribuídos nas mesorregiões: Serrana, Sul, Vale do Itajaí; Norte e Oeste. A determinação dos pontos de coleta foi realizada ao acaso, através de visitas *in loco*. Para cada ponto de amostragem foram coletados cinco nódulos, acondicionados em ambiente refrigerado e transportados ao laboratório de biotecnologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, Lages/SC.

Os nódulos foram desinfestados por um minuto em etanol 70% e três minutos em hipoclorito de sódio 3% conforme procedimento padrão, descrito por Hungria (1994). Logo após, foram lavados em água esterilizada por cinco vezes, macerados e riscados com auxílio de alça de platina em placas de Petri contendo meio levedura manitol ágar (LMA) e vermelho congo (CAMPO & HUNGRIA, 2007). As placas foram incubadas a 28°C e observadas diariamente até o aparecimento de colônias bacterianas. Quando necessário, as amostras foram repicadas até o aparecimento de colônias puras.

Após o crescimento bacteriano, foi procedida a caracterização morfológica dos isolados. As variáveis analisadas foram: velocidade de crescimento, tamanho das colônias; borda; alteração de pH do meio LMA, com indicador azul de bromotimol; elevação; transparência; cor e produção de muco.

A partir dos dados de caracterização morfológica dos isolados, preparou-se uma matriz binária, onde 0 indica ausência da característica e 1 a presença. O agrupamento foi realizado através do programa PAST 1.69 (Paleontological Statistics) (HAMMER, HARPER, & RYAN, 2001), usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard. A partir do resultado do agrupamento foram calculados os índices de Shannon, Margalef e Simpson, com auxílio do mesmo programa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das coletas realizadas de nódulos de bracatinga, foram obtidos 295 isolados bacterianos, oriundos de 61 diferentes locais da região estudada. Na caracterização morfológica, todos os isolados apresentaram borda lisa, sendo que 94% obtiveram crescimento rápido, 66% das colônias foram menores que 1 mm, 81% acidificaram o meio de crescimento, 83% foram opacas, 72% das colônias

eram puntiformes e achatadas, 81% tiveram coloração branca e as demais roxas. Em relação ao muco, 15% produziram muito, 9% níveis medianos e 76% pouco muco.

Lammel (2007), estudando nódulos de *M. scabrella* coletados no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, relatou resultados semelhantes: dos 60 isolados dessa espécie, 72% apresentaram crescimento rápido, 90% acidificaram o meio e todos apresentaram pouca produção de muco.

Martins et al. (1997), em sua revisão sobre o assunto, relataram que as características de crescimento rápido e de acidificação do meio estão relacionadas, visto que bactérias utilizam diferentes vias metabólicas para alcançar seus nutrientes e que essas características podem estar relacionadas a maior eficiência desses organismos na utilização da maioria dos substratos, conferindo vantagem competitiva na rizosfera.

Embora os solos da região estudada sejam predominantemente ácidos, o maior percentual encontrado de bactérias que acidificam o meio, não significa relação direta com esse fato. De acordo com Norris (1965), ao contrário do que se espera, as estirpes produtoras de ácidos não são mais tolerantes a acidez no solo.

A produção de muco está diretamente relacionada com o tamanho da colônia, uma vez que colônias puntiformes são secas ou produzem pouco muco. Apesar dos mecanismos de ação da presença de muco ainda não sejam totalmente conhecidos, alguns trabalhos relacionam sua ausência a bactérias mais eficientes simbioticamente e a presença de muco como adaptação a ambientes com altas temperaturas e como proteção a estresses (MARTINS et al., 1997).

O dendograma baseado nas características morfológicas permitiu agrupar os 295 isolados em 37 morfotipos (Tabela 1) com um nível de similaridade de 90%. O grupo mais comum (G7) apresentou 93 isolados, com as características mais comuns. No entanto, nenhuma bactéria desse grupo foi encontrada na região Sul do estado. 17 grupos foram formados com apenas 1 isolado, o que pode indicar alta diversidade de bactérias que nodulam a *M. scabrella* ou até contaminantes. Nesse caso, recomenda-se teste de nodulação com sementes de bracatinga, para confirmar se a bactéria é fixadora de nitrogênio.

Com nível de similaridade de 80% foram formados 20 grupos. Esses resultados demonstraram maior variação que os encontrados por Lammel (2007), onde o agrupamento dos isolados bacterianos de nódulos de *M. scabrella* resultou em seis subgrupos, concentrando a maioria em um grupo caracterizado como *Rhizobium tropici*.

Deve-se levar em conta que os critérios de identificação das características fenológicas não são conclusivos, uma vez que não distinguem α -rizóbio de β -rizóbios. Para tal, devem-se usar métodos moleculares. No exame do quadro de estirpes nodulíferas do gênero *Mimosa* da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia previamente

catalogadas como *Rhizobium sp.*, utilizando-se sequências de 16S RNAr, foi demonstrado que essas estirpes pertenciam, na verdade, ao gênero *Burkholderia* (REIS JUNIOR et al., 2006).

Os índices de diversidade de Shannon-Weaver, riqueza de Margalef e dominância de Simpson (Tabela 2) foram calculados para os grupos morfológicamente distintos de bactérias noduladoras em *M. scabrella*. Os cálculos mostraram grande diversidade e riqueza de bactérias que nodulam a bracatinga. Quando separamos estes resultados por mesorregião, encontramos maiores índices de Shannon na região serrana, talvez por ser a região com melhor distribuição dos pontos amostrados e maior ocorrência da *M. scabrella* entre as mesorregiões.

No entanto, esta mesma região apresentou o maior índice de Simpson, que está relacionado à dominância, o que indica a presença predominante de alguns grupos de bactérias.

Tabela 2 – Índices de diversidade de Shannon-Weaver, riqueza de Margalef e dominância de Simpson de isolados de nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de SC.

	Shannon	Margalef	Simpson
Total	2,66	6,33	0,86
Mesorregião			
Serrana	2,48	3,04	0,90
Oeste	2,14	3,58	0,81
Norte	1,82	2,43	0,78
Grande Fpolis	1,64	2,46	0,78
Sul	2,15	3,42	0,85
Vale Itajaí	1,11	1,18	0,56

A região Oeste apresentou o maior resultado relacionado ao índice de Margalef (3,58), que se refere a riqueza de espécies. Esta mesorregião possui grande extensão territorial e diversidade de solos dentre as áreas amostradas, o que pode ter relação com este resultado. No entanto, quando avaliamos este índice com todas as mesorregiões encontramos um valor ainda mais alto (6,33), o que pode indicar a ocorrência de organismos endêmicos em cada mesorregião estudada.

Os menores valores dos índices encontrados para a mesorregião do Vale do Itajaí podem estar relacionados aos pontos amostrados, pois a maior parte tratavam-se de áreas próximas à cultivos ou cultivadas recentemente. Essas áreas tendem a ser mais homogêneas no que tratam das características físicas e químicas do solo.

CONCLUSÕES

As principais características morfológicas de bactérias fixadores de nitrogênio em bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina são

o crescimento rápido, colônias brancas, puntiformes, achatadas com borda lisa, menores que 1mm, opacas, que produzem pouco muco e acidificam o meio de cultura.

Através do dendograma, formaram-se 37 grupos distintos, caracterizando os morfotipos.

Os índices mostraram alta diversidade e riqueza de espécies que nodulam *M. Scabrella*, embora tenham sido diferentes entre as mesorregiões estudadas.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 13**, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, nº 58, 25 de março de 2011, p. 3-7.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. 2007. **Anais da XII reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina: Embrapa. 212p. (Embrapa Soja. Documentos, 290).

CARVALHO, P. E. R. 2002. **Bracatinga**. Colombo: Embrapa Florestas. 12 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 59).

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. M.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. 2007. *Burkholderia nodosa sp. nov.*, isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, n.5, p.1055-1059.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. 1988. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. Curitiba: Embrapa CNPF. 70pp. (Embrapa-CNPF. Documentos, 20).

FREITAS, E. A. G. de; DUFLOTH, J. H.; GREINER, L. C. 1994. **Tabela de composição químico-bromatológica e energética dos alimentos para animais ruminantes em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri. 33 p. (Epagri. Documentos, 155).

HAMMER, O, HARPER, D. A. T & RYAN, P. D. 2001. **PAST: Paleontological Statistics software Package for Education and Data Analysis**. Paleontologia electronica.

HUNGRIA, M. 1994. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: Hungria, M., Araújo, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa. p 45-62.

LAMMEL, D. R. 2007. **Diversidade de rizóbios em Floresta de Araucária no estado de São Paulo**. 2007. 117f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo.

MARTINS, L. M. V; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. 1997. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Seropédica: CNPAB. 14p. (Embrapa Agrobiologia, comunicado técnico, n.19).

NORRIS, D. O. 1965. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**. The Hague, v.22, n.2, p.143-166.

REIS JUNIOR, F. B.; FARIA, S. M.; MENDES, I. C.; SIMON, M. F.; LOUREIRO, M. F.; ELLIOT, G. N.; YOUNG, P.; SPRENT, J.; JAMES, E. K. 2006. **Beta-Rizóbios: os novos simbioses encontrados em**

espécies de Mimosa. Planaltina: Embrapa Cerrados. (Embrapa Cerrados. Documentos, 153).

VANDAMME, P.; COENYE, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.6, p.2285-2289.

Tabela 1. Grupos morfológicos de rizobactérias nodulantes em bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de SC.

Grupos/nº de isolados	Características dos isolados ²								
	TC	pH	DC	FC	Tr	EI	BC	CC	TM
G1 / 1	R	Al	> 1mm	P	T	A	Ir	B	Me
G2 / 1	R	Ac	> 1mm	P	T	A	Ir	B	P
G3 / 1	R	Al	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G4 / 1	R	Ac	< 1mm	P	O	C	L	B	P
G5 / 37	R	Ac	< 1mm	P	O	A	L	R	P
G6 / 5	R	Al	< 1mm	P	O	A	L	R	P
G7 / 93	R	Ac	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G8 / 4	R	N	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G9 / 18	R	Al	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G10 / 10	R	Ac	< 1mm	P	T	A	L	R	P
G11 / 15	R	Ac	< 1mm	P	T	A	L	B	P
G12 / 6	R	Ac	> 1mm	C	O	A	L	B	P
G13 / 1	R	Ac	< 1mm	C	O	A	L	B	P
G14 / 13	R	Ac	> 1mm	P	O	A	L	B	P
G15 / 1	R	Ac	> 1mm	P	O	A	L	R	P
G16 / 6	I	Al	< 1mm	P	O	C	L	B	P
G17 / 4	I	Al	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G18 / 1	R	N	> 1mm	C	O	C	L	B	A
G19 / 3	R	N	> 1mm	C	T	C	L	B	Mu
G20 / 8	R	Ac	> 1mm	C	T	C	L	B	Mu
G21 / 8	R	Ac	> 1mm	C	O	C	L	B	Mu
G22 / 5	R	Ac	> 1mm	C	O	C	L	B	P
G23 / 2	R	Al	> 1mm	C	O	C	L	B	P
G24 / 1	R	Al	> 1mm	C	T	C	L	B	P
G25 / 23	R	Ac	> 1mm	C	O	C	L	B	Me
G26 / 3	R	Ac	> 1mm	C	O	C	L	R	Me
G27 / 1	R	Ac	< 1mm	P	O	A	L	B	P
G28 / 2	R	N	> 1mm	C	O	C	L	B	Me
G29 / 1	I	Ac	> 1mm	C	T	C	L	B	Me
G30 / 7	R	Ac	> 1mm	C	T	C	L	B	Me
G31 / 1	R	Ac	> 1mm	P	O	A	L	B	Me
G32 / 3	R	Ac	> 1mm	P	O	C	L	B	Me
G33 / 1	I	N	> 1mm	C	O	C	L	B	Me
G34 / 5	I	Al	> 1mm	C	O	C	L	B	Me
G35 / 1	I	Ac	> 1mm	C	O	C	L	B	Me
G36 / 1	R	N	> 1mm	C	T	C	L	B	Me
G37 / 1	I	N	> 1mm	C	T	C	L	T	Me

² TC – tempo de crescimento (R: rápido ≥ 3 dias; I: 4 a 5 dias; L: ≤ 6 dias); pH do meio (Ac: Ácido; N: Neutro; Al: Alcalino); DC – diâmetro da colônia em mm; FC – Forma da colônia (P: puntiforme; C: circular); Tr – transparência (T: transparente; O - opaca); EI – Elevação (A: achatada; C: cupular); BC – Borda da colônia (L: lisa); CC – Cor da colônia (B:branca; R: roxa); QM – quantidade de muco (P: pouco; Me: médio; Mu: muito; A: abundante).