DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE *Mimosa paranapiacabae*

Milena Serenato Klepa (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Jesiane Stefania Batista da Silva (Orientadora), e-mail: jesiane.batista@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Microbiologia/Microbiologia aplicada.
Palavras-chave: Campos Gerais; *Mimosa* sp; Fixação Biológica de Nitrogênio; Beta-rizóbios; *Paraburkholderia* sp.

Resumo
O estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos radiculares da espécie nativa *M. paranapiacabae,* endêmica de campos de altitude do Paraná. O solo da área de amostragem foi caracterizado como ácido, altos níveis de Al e pobre em C orgânico. Poucas variações foram constatadas quanto aos parâmetros morfofisiológicos, já os perfis de BOX-PCR revelaram a formação de quatro grupos distintos e duas estirpes apresentando perfis únicos. A árvore filogenética de sequencias parciais do gene 16S rDNA permitiu a classificação das estirpes no gênero *Paraburkholderia*, sendo que as pertencentes ao clado I não agruparam com nenhuma espécie reconhecida de *Paraburkholderia* enquanto o clado II agrupou a estirpe tipo da espécie *P. nodosa*. As estirpes agrupadas no clado I requerem estudos filogenéticos adicionais pois podem representar uma nova espécie. Visto que o Brasil é um importante centro de diversidade do gênero *Mimosa*, demonstra-se ainda a necessidade de investigação de espécies nativas e endêmicas na caracterização de novos grupos taxonômicos de rizóbios e na investigação das relações evolutivas entre rizóbios-leguminosas.

Introdução

Uma importante via de incorporação de nitrogênio à biosfera se dá via fixação biológica de nitrogênio (FBN), a qual consiste na redução enzimática do N atmosférico a formas assimiláveis por bactérias diazotróficas. Dentre as mesmas, os rizóbios destacam-se por sua capacidade de estabelecer relações simbióticas com plantas da família Fabaceae, por meio de específica sinalização molecular entre os simbiontes, infecção de pelos radiculares e organogênese dos nódulos, no interior dos quais a FBN ocorre, disponibilizando N diretamente aos tecidos vegetais (SCHULTZE e KONDOROSI, 1998).

Até recentemente, acreditava-se que apenas bactérias da classe Alfaproteobacteria eram capazes de nodular plantas da família Fabaceae pois os estudos eram focados em plantas de importância agronômica. No entanto, um número crescente de publicações vem evidenciando a nodulação de leguminosas por Betaproteobacteria (MOULIN et al., 2001), principalmente vegetais do gênero *Mimosa* em ambientes naturais. O Brasil, sendo o principal centro de diversificação de tal gênero, possui grande potencial quanto à diversidade de rizóbios associados às mesmas (REIS JUNIOR et al., 2010).

Localizada na porção centro leste do estado do Paraná, a região dos Campos Gerais, apresenta inúmeros sítios ecológicos já implementados como unidades de conservação, onde o Parque Estadual do Guartelá, destaca-se pela variedade de fitofisionomias e diversidade de espécies vegetais, sendo a família Fabaceae uma das mais recorrentes (CARMO, 2006). A região apresenta um número considerável de espécies de tal família com habilidade nodulífera, dentre as quais *M.*

paranapiacabae, é uma espécie endêmica de campos de altitude do estado que teve recentemente seu primeiro relato de nodulação (KLEPA et al., 2016). Nesse contexto, o presente estudo visou caracterizar a diversidade de rizóbios associados a tal espécie.

Material e Métodos

Espécimes de *M. paranapiacabae* contendo nódulos radiculares foram coletados no Parque Estadual do Guartelá (autorização no. 49604, ICMBio). Os solos das áreas de amostragem de plantas nodulíferas também foram coletados para realização de análises físico-químicas. Os nódulos foram desinfestados e macerados para isolamento de rizóbios (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994) e colônias isoladas foram caracterizadas quanto aos aspectos morfofisiológicos (HUNGRIA e SILVA, 2011). Os isolados foram depositados na "Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais da Embrapa Soja".

O DNA dos isolados foi extraído e submetido à técnica de BOX-A1R (Batista et al. (2007). Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e os perfis foram analisados (Bionumerics v.4.6) para construção de um dendrograma. A partir dos dados do dendrograma de BOX-PCR, oito estirpes foram selecionadas para amplificação e sequenciamento do gene 16s rDNA (WEISBURG *et al.*, 1991). Os produtos de PCR com cerca de 1500pb foram purificados e sequenciados. As sequências parciais obtidas foram corrigidas (Geneious v.7.1) e a árvore filogenética foi construída no programa MEGA v. 6.1.

Resultados e Discussão

Poucas variações foram observadas quanto à morfofisiologia das colônias dos quatorze rizóbios isolados de três espécimes de *M. paranapiacabae.* Todos os isolados corresponderam a Gram-negativos que apresentaram reação ácida em meio YM; o crescimento variou de rápido à intermediário, as colônias apresentaram formato circular, coloração rosada e pouca massa de consistência.

O dendrograma resultante da análise dos perfis de BOX-PCR evidenciou a formação de quatro grupos, sendo que as estirpes G37.01 e G38.02 apresentaram perfis individuais únicos, enquanto que G38.04 e G38.05 apresentaram perfis idênticos, do mesmo modo que G36.02, G36.03 e G36.04 (Figura 1).

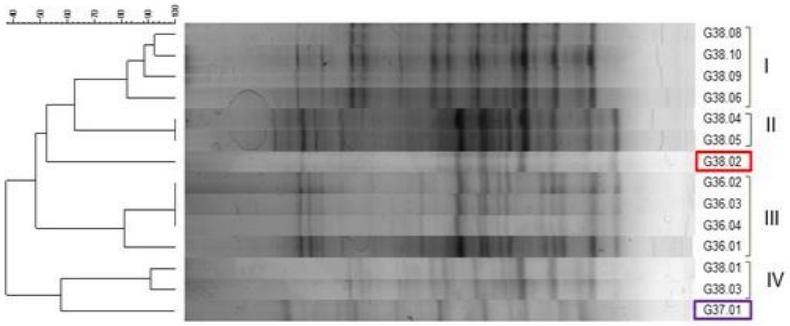


Figura 1: Dendrograma de BOX-PCR de rizóbios isolados de *M. paranapiacabae*, utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância.

A partir disso, uma estirpe representante de cada grupo foi selecionada, bem como as estirpes com perfis únicos para a filogenia do gene 16S rDNA. Todas as estirpes foram classificadas como *Paraburkholderia* sp. (Figura 2). O clado I agrupou apenas as estirpes do presente estudo, com elevado suporte estatístico (99% de *bootstrap*). A espécie mais relacionada do grupo foi *P. peleae,* recentemente descrita, isolada de solos vulcânicos do Hawaii e com capacidade de oxidar CO,

demonstrando a versatilidade metabólica de tal gênero (WEBER e KING, 2017). Já em relação ao clado II, quatro estirpes foram agrupadas a estirpe tipo de *P. nodosa* Br3437, a qual foi inicialmente isolada de nódulos radiculares de plantas arbóreas do gênero *Mimosa* no Brasil (CHEN et al., 2007).

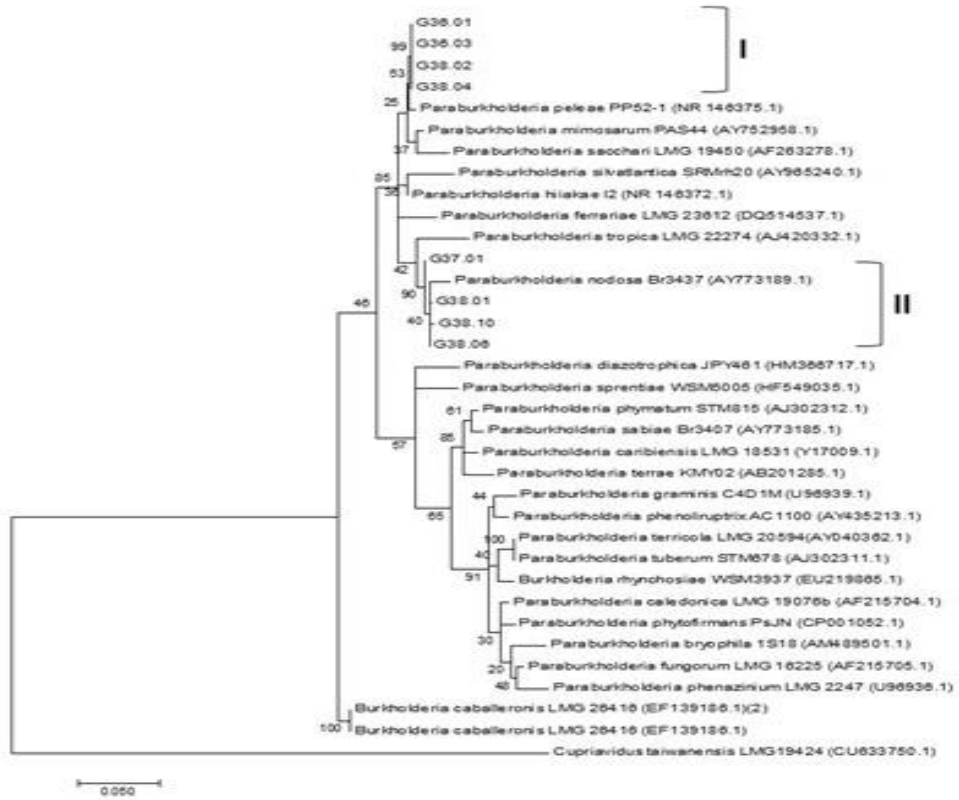


Figura 2 Árvore filogenética de sequências parciais do gene 16S DNAr de rizóbios isolados de *M. paranapiacabae* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3-parametros com distribuição G+I, 1000 repetições Bootstrap)

O solo da área de amostragem foi caracterizado como arenoso, ácido (pH 3,8), com baixo teor de C orgânico e elevada concentração de Al. Tais fatores afetam as comunidades microbianas do solo e o desenvolvimento vegetal, devido ao fato de que o Al, em solos com pH < 5, passa à forma trivalente (Al^{+3}), a qual é tóxica para inúmeras espécies microrganismos e vegetais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). No entanto, estudos demonstraram que espécies de *Paraburkholderia*/*Burkholderia* apresentam tolerância a baixos pH (STOPNISEK et al., 2013).

A nodulação de *Mimosa* por betaproteobactérias é especialmente verificada na América do Sul (REIS JR et al., 2010) enquanto no México, outro importante certo de diversificação do gênero, verifica-se a preferência alfaproteobacterias (BONTEMPS et al., 2016). Uma importante justificativa para tal diferença seria a capacidade adaptativa superior de beta-rizóbios às condições edáficas relatadas, visto que os solos mexicanos são predominantemente alcalinos.

Conclusão

Pode-se inferir que o gênero *Paraburkholderia* seja o principal microssimbionte de *M. paranapiacabae*. Além disso, por tratar-se de uma espécie hospedeira nativa da região, a qual dispõe de elevado nível de endemismo em campos de altitude no estado do Paraná e escassos relatos na literatura, faz-se necessário

aprofundamento na caracterização filogenética das estirpes agrupadas no clado I (filogenia do gene 16S rDNA) pois podem vir a representar uma nova espécie bacteriana. Devido ao fato da pesquisa ocorrer em um ambiente natural, o qual contempla inúmeras espécies da família Fabaceae, estudos desse cunho podem futuramente servir como subsídios para recuperação e reflorestamento de ecossistemas degradados, além de abrir novas perspectivas para aplicações tecnológicas.

Agradecimentos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biodiversidade (UEPG) com apoio financeiro da Fundação Araucária, e apoio financeiro e técnico-científico do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva (UEPG), Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa e Embrapa Soja – Londrina/PR.

Referências

BATISTA, J. S. S., Et al. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* Seven Years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 270-284, 2007.

BONTEMPS C., Et al. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319-333, 2016.

CARMO, M. R. B. **Caracterização fitofisionômica do Parque Estadual do Guartelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná**. 2006, 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas - UNESP, Rio Claro, 2006.

CHEN, W.M., Et al. *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, 2007.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R, S. **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola.** Brasília: EMBRAPA, 1994.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal.** Brasília: EMBRAPA, 2011.

KLEPA, M. S. Et al. Levantamento de espécies de Fabaceae nodulíferas nativas dos Campos Gerais (Paraná – Brasil). In: XXVII RELAR - Reunião Latinoamericana de Rizobiologia, 2016, Londrina. **Anais da XXVII RELAR - Reunião Latinoamericana de Rizobiologia: fortalecendo as parcerias Sul-Sul**. Curitiba: NEPAR, 2016, 160p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras – MG: Editora UFLA, p. 744, 2006

MOULIN, L.; Et al. Nodulation of legumes by members of the β-subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411**,** p. 948-950, 2001.

REIS JUNIOR, F. B. Et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the cerrado and caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**. v. 186, n.4, p. 934–946, 2010.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v.32, p.33-57, 1998.

STOPNISEK, N., Et al. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil Burkholderia populations. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1503-1512, 2013.

WEBER, C. F.; KING, G. M. Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing Paraburkholderia and Burkholderia: Paraburkholderia hiiakae sp. nov., Paraburkholderia metrosideri sp. nov., Paraburkholderia paradisi sp. nov., Paraburkholderia peleae sp. nov., and Burkholderia alpina sp. nov. a member of the Burkholderia cepacia complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

WEISBURG, W.G., Et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. v.173, p. 697-703, 1991.