



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS
DE RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DO
SEMIÁRIDO PARAIBANO**

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO

AREIA – PB
FEVEREIRO-2012

PAULA FRASSINETTI MEDEIROS DE PAULO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS
DE RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DO
SEMIÁRIDO PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Comitê de Orientação:
Prof. D. Sc. Alberício Pereira de Andrade
Prof. D. Sc. Adailson Pereira de Souza
Prof. D. Sc. Divan Soares da Silva

AREIA-PB
FEVEREIRO-2011

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.*

P331c Paulo, Paula Frassinetti Medeiros.

**Caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbios de leguminosas
forrageiras do Semiárido paraibano/ Paula Frassinetti Medeiros Paulo. - Areia:
UFPB/CCA, 2012.**

xii, 88 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade
Federal da Paraíba, Areia, 2012.
Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade.

*1. Estirpe. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Forragem. I. Andrade,
Alberício Pereira de (Orientador) II. Título.*

UFPB/CCA

CDU: 631.461.5(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbios em leguminosas forrageiras do Semiárido Paraibano”

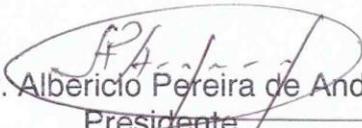
AUTORA: Paula Frassinetti Medeiros de Paulo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

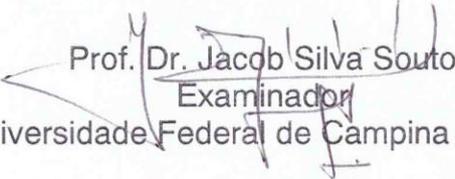
JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:


Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Profa. Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas
Examinadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco


Prof. Dr. Jacob Silva Souto
Examinador
Universidade Federal de Campina Grande

Areia, 29 de fevereiro de 2012

A Deus,

Aos meus pais Francisco e Nancy,

Que me ensinaram o sentido da vida,

Amor e compreensão,

Pelo esforço e trabalho que possibilitaram meu estudo,

Pela educação, lições de vida e moral.

E por terem sempre acreditado nos meus objetivos.

Sem o apoio e o carinho de vocês eu não estaria aqui.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora que sempre me abriu janelas quando as portas se fechavam e por colocar no meu caminho pessoas especiais e por te permitido chegar onde cheguei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de fazer o mestrado.

Ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) por seder a área para realização da etapa inicial do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade, pela confiança e inúmeros ensinamentos e por me dar o privilégio de fazer parte da sua equipe.

Ao Prof. Dr. Adailson Pereira da Silva, pela valiosa co-orientação e pela confiança no uso do seu laboratório, pelos ensinamentos e sugestões na execução do trabalho.

Ao Prof Dr. Divan Soares da Silva pela co-orientação e contribuições a este trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, pelas horas dedicadas.

À minha GRANDE FAMÍLIA, avós, tias, tios, primas e primos, pelo carinho e apoio mesmo à distância sempre estiveram presentes em minha vida, me apoiando e incentivando. Em especial a minha irmã Polliana, pelo apoio e confiança durante toda a minha vida.

Aos meus amigos, que fiz em Areia e que vou levar pela minha vida inteira, Rayssa Bezerril, Ariana Meira, Mayara Sabedot, Gabriela Mafra, Welligton Lopes, Geovania canasfístula, Natali Rodrigues, Ebson Pereira, Daniel Farias, Rebeca Ribeiro, que me ajudaram e apoiaram nesta etapa da minha vida, tornando sem duvidas meu mestrado mais alegre.

Aos amigos do grupo de pesquisa Lavoura Xerófilas, Ariane, Luiza, Kalliana, Mariah, Alex, Diogo, Erico, pelos momentos de convivência acadêmica, científica e de descontração.

A todos do Laboratório de Biotecnologia de Solo e Água, Alane, Pedro, Valério, Silvania, em especial a Cristina, pela imensa ajuda durante as análises, dedicação, companheirismo, amizade e por ter contribuído diretamente para o trabalho.

Aos amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho e com os quais tive o privilégio de conviver, trocando experiências acadêmicas.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa,
que fez a tua rosa tão importante.”

Antoine Saint Exupéry

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Figuras.....	X
Resumo Geral.....	XII
Capítulo 1- Referencial Teórico	
1. Introdução.....	14
2. Referencial Teórico.....	16
2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	16
2.2 Fixação biológica de Nitrogênio em leguminosas.....	19
2.3 Rizóbios.....	21
2.4 Taxonomia de rizóbios.....	23
2.5 Leguminosas Forrageiras.....	25
2.5.1 Feijão-de-rolinha.....	26
2.5.2 Jureminha.....	27
2.5.3 Jurema Branca.....	28
2.5.4 Jurema Preta.....	29
3. Referências Bibliográficas.....	32
Capítulo 2 - Caracterização morfofisiológica de isolados obtidos a partir de nódulos de leguminosas forrageiras	
Resumo.....	42
Abstrat.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	53
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

Capítulo 3 - Tolerância de rizóbios de leguminosas forrageiras do semiárido paraibano a níveis de salinidade, temperatura e pH do meio de cultura.

Resumo.....	70
Abstrat.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	74
Resultados e Discussão.....	77
Conclusões.....	81
Referências Bibliográficas.....	82

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Características culturais dos gêneros de rizóbios em meio de cultura YMA.

Capítulo II

Tabela 1. Potencial de nodulação das leguminosas forrageiras da região Semiárida Paraibana.

Tabela 2. Relação do número de isolados de espécies de feijão de rolinha, jureminha, jurema branca, jurema preta da região Semiárida.

Tabela 3. Identificação dos gêneros de isolados obtidos a partir das características fenotípicas.

Capítulo II

Tabela 1. Condutividade Elétrica do meio de cultura de acordo com os níveis de NaCl aplicados

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Formação e desenvolvimento do nódulo na raiz da leguminosa.

Capítulo II

Figura 1. Vista parcial da circunferência de coleta das raízes.

Figura 2. Nódulos coletados da Jurema Preta coletados no campo e preservados em sílica em gel.

Figura 3. Nódulos obtidos a partir de solo rizosferico.

Figura 4. Riscagem e incubação dos isolados bacterianos.

Figura 5. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de Vermelho Congo

Figura 6. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de Vermelho Congo, com produção de goma abundante e pouca, respectivamente.

Figura 7. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de azul de bromotimol.

Figura 8. Tempo de crescimento em meio LMA, obtidos dos nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana

Figura 9. Tamanho, elevação da colônia e a produção de muco dos isolados bacterianos, em meio LMA, obtidos dos nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana.

Figura 10. Forma, superfície, coloração e transparência da colônia de rizóbios, em meio YMA, proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana.

Figura 11. Modificação de pH em meio LMA de rizóbios proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Figura 12. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jurema preta, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente Jaccard.

Figura 13. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da feijão-de-rolinha, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente Jaccard.

Figura 14. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jurema branca, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente Jaccard.

Figura 15. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jureminha, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente Jaccard.

Capítulo III

Figura 1. Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a salinidade.

Figura 2. Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a temperatura, pH e salinidade.

Figura 3. Tolerância a diferentes concentrações de NaCl, em meio LMA líquido, de isolados proveniente de nódulos de espécies de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Figura 4. Tolerância a diferentes temperaturas, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de espécies de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Figura 5. Tolerância a diferentes níveis de pH, em meio LMA líquido, de isolados proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

RESUMO GERAL

No Semiárido brasileiro, a caatinga constitui a maior parte das pastagens utilizadas para produção animal. Dentre as espécies vegetais as leguminosas são as mais abundantes nessa região, das quais várias apresentam capacidade de formar nódulos em simbiose com bactérias do grupo rizóbio. Essa simbiose pode beneficiar a manutenção da leguminosa em detrimento às demais famílias de plantas, por permitir a fixação biológica do nitrogênio (FBN), além de melhorar a fertilidade do solo rizosférico. O presente trabalho teve-se como objetivo isolar e avaliar a diversidade cultural de rizóbios a partir de nódulos das espécies o feijão de rolinha (*Macroptilium lathyroides*), jureminha (*Desmanthus pernambucanus*), jurema branca (*Mimosa artemisiana*) e jurema preta (*Mimosa tenuiflora*). Para isso, foram utilizados nódulos obtidos no campo, nos períodos seco e chuvoso, como também através do cultivo de plantas iscas em solo rizosférico proveniente da região em estudo. Essas bactérias foram inoculadas em meio específico sendo obtido um total de 560 isolados. Desse total, foram utilizados 50 isolados por espécie, para caracterização morfológica e fisiológica (tempo de crescimento, forma, diâmetro, borda, elevação, transparência e coloração da colônia, produção de goma). Já para a caracterização fisiológica, o crescimento desses isolados foi avaliado em diferentes concentrações de salinidade, temperatura, níveis de pH e alteração do pH no meio. Ao final foi possível obter 35 grupos com 61 fenótipos distintos, demonstrando enorme diversidade. Essas estirpes apresentaram alta eficiência quando submetidas aos testes de tolerância a salinidade, temperatura e pH, sendo verificado que os isolados com produção de muco moderada a abundante, identificados na Jurema Preta, apresentaram maior tolerância aos testes supracitados. Assim, possivelmente os rizóbios nativos adaptados às condições adversas da região podem incrementar a produção de leguminosas nativas, que pode beneficiar diretamente os produtores.

Palavras-chaves:

Capítulo I

REFERENCIAL TEÓRICO

1- INTRODUÇÃO

As leguminosas são pastagens de grande importância seja como fonte protéica para os animais, seja como suprimento de nitrogênio ao sistema, via Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), seja na melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Oliveira et al., 1998).

Embora a atmosfera terrestre seja composta por cerca de 78% de nitrogênio, na forma de N_2 , este imenso compartimento não está disponível para a maioria dos vegetais, que dependem do N da matéria orgânica do solo ou da adição de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, plantas da família das leguminosas podem, em associação com determinados micro-organismos, conseguir uma parte ou a totalidade de sua nutrição nitrogenada diretamente do ar, através do processo de FBN. A FBN é o processo realizado por microrganismos, denominados diazotróficos, que captam o nitrogênio atmosférico e o converte em amônia, forma disponível para as plantas. Esta interação é fundamental para o fornecimento de N_2 em sistemas agroecológicos, pois as bactérias reduzem o N_2 atmosférico a moléculas assimiláveis pela planta. (referência)

Estes microrganismos ocorrem naturalmente na maioria dos solos, sendo chamados genericamente de rizóbios, reconhecidos pela capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas. Diversos gêneros de bactérias já foram relatados como simbioses de leguminosas, entre os quais, cita-se: *Rizobium*, *Azorizobium*, *Bradryzobium*, *Sinorizobium*, etc.

Parte significativa das necessidades do nitrogênio das leguminosas em pastagem é oriunda da FBN. Alguns autores (Vallis e Gardener, 1985; Peoples e Herridge 1990; Vargas 1991) trabalhando com leguminosas forrageiras tropicais, crescendo em diferentes situações, encontraram valores de 75 a 97% de nitrogênio da planta, como sendo oriundos deste processo. Isto realça não só a importância da FBN para a leguminosa, mas também de se ter uma estirpe mais eficiente no processo simbiótico.

A maioria dos solos, tanto os cultivados quanto os sob vegetação nativa, são deficientes em nitrogênio, e para garantir uma boa produtividade das plantas é necessário que este nutriente seja aportado ao sistema através da adição de compostos ricos em nitrogênio. Para a agropecuária de subsistência do semiárido, o fertilizante químico é pouco usado porque o risco de não pagar o investimento é grande.

Assim, o nitrogênio fixado pela associação de bactérias com leguminosas, pode representar uma alternativa importante, com as vantagens de ser economicamente mais viável para a região Semiárida. A FBN influencia a produtividade dos solos deficientes,

incorporando grandes quantidades de nitrogênio atmosférico no sistema solo - planta (Moreira, 1994), proporcionando um maior equilíbrio nutricional para as plantas e maior resistência do sistema ao aparecimento de pragas e doenças. Essas características contribuem para o desenvolvimento de outras espécies vegetais, garantindo a auto-sustentabilidade do ecossistema com relação ao nitrogênio.

No entanto, o nitrogênio fixado pela leguminosa forrageira depende, entre outros fatores, de uma cuidadosa seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio. Contudo, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Moreira e Siqueira 2002).

No presente estudo teve-se como objetivo o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios isolados de nódulos das espécies Feijão de rolinha, Jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta, bem como selecionar as estirpes com maior capacidade de tolerar diferentes níveis de salinidade, pH e temperatura para posterior análise do potencial para fixação biológica de nitrogênio.

2. Referencial Teórico

2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais para a sustentabilidade de ambientes terrestres e para a produção agrícola, principalmente nos solos poucos férteis das regiões tropicais, depois da necessidade de água (Bezerra, 2009). É o constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas.

A maior parte do N da natureza está na atmosfera sob a forma de gás (em torno de 78%), constituída por dois átomos de nitrogênio (N_2), que se encontram unidos de uma maneira muito estável, impossibilitando sua absorção e assimilação por organismos eucariontes (plantas e animais). Apenas uma porção dos organismos procariotos conseguem converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio atmosférico, transformando-o em amônia e posteriormente em elementos essenciais (Lodeiro et al., 2000).

Os organismos com habilidade para reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia são considerados diazotróficos. As bactérias que formam associações simbióticas com hospedeiros específicos e fixam nitrogênio, formando estruturas especializadas nos hospedeiros, são chamadas diazotróficos simbióticos. (Sawada et al., 2003).

A observação de uma árvore filogenética contendo espécies procarióticas mostra que os microrganismos diazotróficos ocorrem em um grande número de *taxa* e sua distribuição não obedece nenhum padrão lógico. Esta característica pode ser explicada por três hipóteses. A primeira é que a capacidade diazotrófica teve origens múltiplas. A segunda é que este caráter diazotrófico estava presente num ancestral comum a todas as espécies, mas foi perdido durante o processo evolutivo que deu origem a diferentes ramos filogenéticos. A terceira é que o potencial diazotrófico teve uma única origem, mas se estendeu à outros ramos filogenéticos por transferência lateral de plasmídeos (Moreira e Siqueira, 2006).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é uma importante via de entrada de nitrogênio em solos agrícolas (Sharma et al., 2006; Rosenblueth e Martínez-Romero, 2006), responsável por cerca de 139 toneladas de Nitrogênio fixado por ano em culturas de soja no Brasil. Segundo Dakora e Keya (1997), as leguminosas podem fixar entre 43 a 581 Kg N por hectare. Nos ecossistemas terrestres situa-se como o segundo processo

biológico mais importante na terra, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, estando atrás apenas da fotossíntese (Moreira e Siqueira, 2002).

Para que o nitrogênio proveniente da fixação biológica possa suprir todas as necessidades da planta, o processo necessita ser eficiente, o que resulta, principalmente, da escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao microsimbionte (Hungria et al., 1994).

O processo de FBN esta dividido em etapas distintas: multiplicação do rizóbio no solo e na rizosfera da planta, emissão de sinais quimiotáticos, reconhecimento, formação do cordão de infecção, desenvolvimento do nódulo, fixação nitrogênio (Vargas e Hungria, 1997; Ferguson e Mathesius, 2003).

O rizóbio tem a capacidade de viver livre no solo, competindo com os demais microrganismos pelos recursos disponíveis (Keyser, et al.,1997), o que pode diminuir significativamente a população de determinada espécie de rizóbio no solo na ausência de um planta hospedeira, mais na presença desta, há um processo de interação química e molecular entre o rizóbio e a planta. A simbiose começa pela produção de exsudados na raiz, principalmente polifenóis (flavonóides), os quais o rizóbio reconhece por meios de mecanismos de quimiotaxia. Após o reconhecimento, as bactérias são atraídas em direção a rizosfera e inicia a síntese dos fatores Nod, exopolissacarídeos sintetizados em resposta a presença dos sinais químicos exsudados pela leguminosa. Esses fatores Nod têm sua síntese comandada por uma série de genes denominados genes *Nod* (Hirsch et al., 2001), responsável pela infecção da raiz e o estabelecimento do nódulo (Taíz e Zieger, 2004).

Após a colonização da rizosfera as bactérias apresentam expressiva divisão celular ao redor dos tricomas radiculares, ativados pelos fatores Nod. Em seguida as bactérias penetram no pêlo radicular e começam intensa multiplicação celular em sentido do córtex da raiz; após as modificações radiculares ocorre à dissolução das paredes celulares, formando um cordão de infecção, cresce em direção a região cortical com intensa divisão celular, onde se ramifica e invade algumas células que darão origem ao nódulo primário, ainda não efetivo. Nesse primórdio, a célula bacteriana sofre uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas, transformando-se em uma célula efetiva para a fixação do N, o bacteróide, que irá se multiplicar novamente dando origem ao nódulo propriamente dito (Perret et al., 2000; Keyser, et al. 1997).

Na fixação biológica, o N_2 é reduzido à amônia (NH_3) à custa de energia da plantas, fornecida ao sistema enzimático sob forma de ATP, proveniente da fotossíntese. O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas responsáveis pela reação de redução do N_2 . A nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a Ferredoxina (Burriss, 1999; Taíz e Zieger, 2004).

Durante os processos de infecção e desenvolvimento dos nódulos (Figura 1), energia é necessária às divisões celulares e é obtida da oxidação dos carboidratos produzidos na parte aérea da planta hospedeira (Franco e Neves, 1992; Silveira et al., 2001).

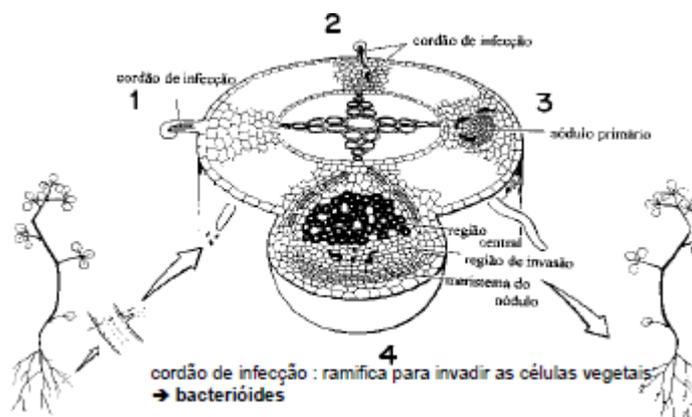


Figura 1. Desenvolvimento do nódulo.

Todavia, os nódulos são estruturas transitórias, que se formam e senescem em curto espaço de tempo. Nas estações secas, em áreas não irrigadas, observa-se a ausência de nódulos, e as taxas de fixação biológica no solo são insignificantes, relacionando-se, às deficiências de FBN com o déficit hídrico (Teixeira et al., 2006).

Inúmeros estudos ressaltam ainda que temperaturas elevadas alteram diversos processos da FBN como o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do rizóbio no solo, a troca de sinais químicos entre os simbiontes, o processo de infecção e nodulação e a atividade enzimática para redução do nitrogênio e assimilação da amônia formada (Hungria e Vargas, 2000).

O primeiro produto estável contendo o N_2 fixado é a amônia. Esta é imediatamente conduzida para fora do bacterióide e incorporada a esqueletos de carbono gerando o glutamato e a glutamina. Esses dois aminoácidos atuam como doadores de N,

transportados para as folhas das plantas através do xilema (Crawford e Glass, 1998; Silveira et. al., 2001)

2.2 Leguminosas e a fixação biológica de nitrogênio

A família das leguminosas consiste na terceira maior família de planta com flores, compreende de 16000 a 19000 espécies, divididas em aproximadamente 750 gêneros, agrupando-se em três subfamílias, com distribuição global. Embora não seja uma característica comum a todas as espécies, a grande particularidade ecológica das leguminosas é a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios (Allen e Allen, 1981; Santos et al., 2008).

A região Semiárida do Nordeste do Brasil é bastante deficiente em nitrogênio e através da fixação do nitrogênio atmosférico (N_2) pelas leguminosas quando associadas a bactérias denominadas genericamente de rizóbios, reduz ou dispensa a adubação nitrogenada, enquanto esta fornece carboidratos para o nódulo bacteriano (Moreira e Siqueira, 2006). Por este motivo, a utilização de leguminosas nas pastagens constitui um dos métodos mais importantes e econômicos de adicionar nitrogênio ao sistema solo-planta-animal (Sá e Vargas, 1997). O crescimento e a produção dessa família é pelo menos em parte, o resultado da interação entre as cultivares das plantas, as estirpes de rizóbio e as condições ambientais em que o sistema simbiótico se desenvolve. Essa interação afeta a assimilação, a distribuição e a utilização do carbono e nitrogênio pelas plantas (Neves e Rumjanek 1998) tendo como consequência o aumento do teor de proteína bruta da forragem (Carvalho et al. 2003).

A família Leguminosae (Fabaceae) apresenta três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Polhill, 1994), das quais se estima que a maioria das espécies nodulantes. Aproximadamente 97% pertencem a Papilionoideae, 90% a Mimosoideae, enquanto menos de 25% das Caesalpinoideae sejam capazes de nodular (Auer e Silva, 1992; Costa, 2010). A maioria dos gêneros da família das leguminosas pode nodular e fixar nitrogênio, embora haja exceções (Sprent, 2001). Entretanto, apenas uma pequena fração do total de espécies leguminosas foi estudada quanto à capacidade de formação de nódulos e eficiências dos mesmos.

Dentre as simbioses de fixadores de nitrogênio, as leguminosas certamente se destacam por sua importância econômica e a maior eficiência do processo decorrente da parceria vegetal e microrganismos mais evoluídos. Essa simbiose ocorre em detrimento

da disponibilização de aminoácidos pela bactéria através da fixação do Nitrogênio e a disponibilização de carboidratos pela plantas em benefício das bactérias (Freire, 1992).

Segundo Bala et al. (2003) a habilidade de leguminosas em formar nódulos está em função da magnitude, distribuição e diversidade de rizóbios em um dado solo. Porém, deve-se ressaltar a existência de diversos fatores que atuam negativamente no processo de FBN, como a salinidade e temperatura elevada.

Espécies de leguminosas em regiões tropicais apresentam menor especificidade em relação à rizóbios quando comparadas com leguminosas em áreas temperadas, o que pode resultar num sistema com FBN menos eficiente, entretanto, ainda assim, importante (Denison e Kiers, 2004). Observa-se que grande proporção de plantas da família *Leguminosae* é capaz de realizar a FBN. Contudo, se faz necessário mais estudos para determinar se realmente essa redução na eficiência seria uma causa relativa aos rizóbios ou uma simbiose menos eficiente. De qualquer forma, acredita-se na importância dessas plantas para manutenção da fertilidade do solo na caatinga (Zahran, 2001; Teixeira et al., 2006).

As estirpe de rizóbio podem nodular uma ou mais espécies de leguminosas, isso ocorre devido ao processo da coevolução destes dois parceiros, em que os sinais químicos emitidos e reconhecidos por ambos os parceiros tornaram-se específicos. A elevada promiscuidade de diversas estirpes é um evento recente, ocasionado por uma série de adaptações das plantas e do rizóbio às variações climáticas locais e de transferência lateral de genes entre as diferentes espécies de rizóbio (Sprent, 1994; Perret et al., 2000). Um exemplo clássico de uma estirpe com alto grau promiscuidade é a estirpe NGR234 de *Rhizobium* sp. que é capaz de nodular 232 espécies de 112 gêneros, incluindo uma espécie de não leguminosa (Perret et al., 2000).

Apesar das dificuldades na obtenção de nódulos em árvores adultas, muitos esforços têm sido feitos no Brasil para identificar espécies de leguminosas capazes de FBN (Faria et al, 1984; 1987; 1989; 1994; Moreira et al, 1992; Souza et al, 1994) porém, estudos feitos se restringiram principalmente a espécies das regiões Sudeste e da Amazônia. A importância quantitativa das leguminosas na caatinga, juntamente com o alto grau de endemismo (Araujo et al., 2002; Queiroz, 2002) autorizam a hipótese de que o conhecimento sobre o status de nodulação das espécies nativas deste bioma é bastante incompleto.

Leguminosas podem ser utilizadas para recuperar solos degradados, como adubo verde, para cultivos em aléias, em consórcio ou rotação com outras culturas, como

cercas vivas, para sombreamento, etc. Elas são importantes produtoras de alimento para o homem (feijão caupi, feijão, soja, amendoim, etc) e para os animais (fornecendo pastagem rica em proteínas) e de outros produtos (estacas, lenha, carvão, gomas, produtos medicinais, etc).

Muitas espécies de leguminosas fixadoras de nitrogênio da flora nordestina possuem importância econômica potencial, como sabiá, angico, jurema preta e branca, mulungu, cumaru, jureminha e feijão de rolinha. Leguminosas exóticas, como gliricídia, leucena e algaroba, também fixam. Mas, outras espécies como catingueira, mororó, canafístula e pau-ferro não fixam nitrogênio atmosférico (Freitas, 2010).

2.3 Rizóbios

Estudos da população de rizóbio do solo possuem papel fundamental, pois o entendimento da composição, das características simbióticas e adaptativas, bem como da taxonomia da população de rizóbio do solo, podem possibilitar a seleção e introdução de novos inoculantes de rizóbio com maior eficiência simbiótica e capacidade competitiva (Zilli, 2001)

Os rizóbios podem sobreviver e reproduzir no solo, mas estas bactérias são conhecidas por fixar nitrogênio através de nódulos nas raízes de plantas leguminosas (Denison e Kiers, 2004). Entre os principais fatores que afetam a nodulação, destacam-se os efeitos do pH do solo e suas interações com outros nutrientes, a disponibilidade de nutrientes no solo e suas interações com a simbiose e o rizóbio, os efeitos da umidade do solo, do estresse osmótico e a sensibilidade à temperatura (Straliozzo e Rumjanek, 1999).

A avaliação do potencial de estirpes nativas de rizóbio em relação à eficiência, competitividade, adaptação às regiões sujeitas à alta temperatura e baixa umidade é importante no estudo da FBN (Carvalho et al., 2001).

Para a maioria dos rizóbios, a temperatura ótima para o crescimento em cultura situa-se entre 28 e 31 °C. Além da temperatura, outras condições ambientais limitam o crescimento e a atividade de fixação do nitrogênio em leguminosas. Dentre estas a salinidade e estiagem são os principais fatores (Zahran, 2001).

A influência da temperatura no crescimento e desempenho do rizóbio é um fator importante, pois solos tropicais podem atingir temperaturas superiores a 40°C nas camadas superficiais, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao processo da fixação simbiótica do nitrogênio nos trópicos (Vargas e Hungria, 1997). Inúmeros

estudos ressaltam ainda que temperaturas elevadas afetam diversos estágios da FBN como o crescimento e sobrevivência do rizóbio no solo, a troca de sinais moleculares entre os simbioses, o processo de infecção e nodulação e a atividade do aparato enzimático para redução do nitrogênio e assimilação da amônia formada (Hungria e Vargas, 2000).

A base da termotolerância e da capacidade de nodular a altas temperaturas permanece desconhecida. Segundo Nandal et al. (2005), isto talvez se deva a certas mudanças metabólicas ocorrendo nas células bacterianas sob condição de altas temperaturas. Geralmente, há o atraso no começo da nodulação, para cada espécie, de acordo com a temperatura fora da faixa ótima para a formação de nódulos, o que possivelmente indica que a redução do número de nódulos pode ser considerada como o efeito geral na simbiose rizobiana de temperaturas fora da faixa ideal nas raízes (Lira Junior et al., 2004).

O estresse salino aparece como um dos muitos fatores ambientais limitantes que afetam a produção das leguminosas em regiões áridas e semi-áridas. Este estresse reduz a nodulação de leguminosas inibindo os eventos simbióticos iniciais, uma vez que o estresse salino na FBN pode causar efeitos na infecção de leguminosas, no crescimento e desenvolvimento do nódulo e, afetando diretamente a atividade da nodulação e a respiração nodular. Entretanto, diferente de seus hospedeiros, os rizóbios podem sobreviver na presença de níveis extremamente elevados de salinidade e apresentar marcante variação de tolerância a essa salinidade (Bouhmouch et al., 2004).

Têm-se o registro da existência de cepas de rizóbios e leguminosas selvagens em zonas áridas que exibem alta tolerância em relação às condições adversas prevalentes como estresses por salinidade, temperaturas elevadas e dessecação (Zahran, 2001).

O valor do pH na faixa de neutro a pouco alcalino ajuda na exudação de carbono pelas raízes das plantas, interferindo na sobrevivência e competição do rizóbio no solo, porque compostos de carbono são substratos para os microorganismos que vivem na rizosfera (Toro, 1996). Sugere-se que rizóbios que vivem em solos com níveis de pH próximo à neutralidade sejam mais tolerantes, inversamente no solo ácido pode abrigar populações mais sensíveis (Lombardi, 1995).

O tamanho da comunidade de rizóbios é dependente de diversos fatores como o histórico do campo, solo, características ambientais, e principalmente a presença de plantas hospedeiras (Slattery et al., 2004). O pH do solo, a acidez trocável, matéria

orgânica, o tipo de solo (arenoso ou argiloso) são os fatores determinantes que afetam a população de rizóbios em uma área (Giongo et al., 2008; Bala et al., 2003).

Segundo Stralio et al. (1999), os fatores que interferem efetivamente na eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio, são as características intrínsecas à bactéria e, outros extrínsecos que se relacionam com a competição com outros microrganismos do solo, como fatores de clima e solo ou determinados pela planta hospedeira, como o genótipo destas.

2.4 Taxonomia de rizóbios

A sistemática bacteriana é definida com sendo o processo de caracterização e arranjo da diversidade em uma maneira ordenada, reconhecendo grupos de organismos similares em uma hierarquia, cuja entidade básica é a espécie (Dellaglio et al., 2004).

Por muito tempo a taxonomia de microrganismos recebeu pouca importância, devido às dificuldades de classificação utilizadas pelos métodos tradicionais, com base essencialmente em características fenotípicas e fisiológicas. O estudo da taxonomia contribuiu na avaliação da biodiversidade no ambiente, fornecendo também informações em relação à expressão de características fisiológicas que podem estar correlacionadas com fatores ambientais (Bull et al. 1992).

A taxonomia das bactérias do grupo dos rizóbios engloba atualmente 12 gêneros, com 62 espécies (Weir, 2009) já foi descritas as seguintes relações de gêneros de bactérias capazes de formar nódulos em leguminosas. Esta lista de espécies cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a serem descritas, na medida em que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e de respectivos rizóbios (Weir, 2006).

Segundo Moreira e Siqueira (2006) os principais gêneros de rizóbios encontrados estão divididos em *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, que podem ser reconhecidos com base nas seguintes morfológicas (Tabela 1).

Os gêneros de rizóbios descritos até o momento podem ser diferenciados com base em características culturais em meio YMA (Vincent, 1970). Os principais parâmetros utilizados são: tempo de crescimento em meio de cultura LMA, reação ácida ou básica em meio de cultura, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares (goma) e coloração da colônia (Martins et. al., 1997).

Com relação ao tempo de crescimento podem, ser enquadradas em cinco grupos: muito rápido, para aquelas colônias que podem ser visualizadas após 1 dia de

incubação; rápido, para aquelas que são visualizadas de 2 a 3 dias de incubação, intermediárias; com 4 a 5 dias; lentas, com 6 a 10 dias e muito lentas, são visualizadas após 10 dias de incubação (Melloni et al., 2006). O tempo de crescimento pode esta relacionado ao ambiente, bactérias de crescimento rápido geralmente são isoladas de solos mais pobre de clima quente e seco, ao contrario das bactérias de crescimento lento encontrada em solos mais férteis com clima menos severo (Bushby e Marshall, 1997; Sprent, 1994).

A alteração do pH do meio de cultura pode ser usada para dividir os isolados em três classes: estirpes que apresentam reação ácida, reação básica ou reação neutra em meio de cultura (Martins et al., 1997). Tan e Broughton (1981) sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento. Estas alterações pode ainda representar uma reação de adaptação ao ambiente, uma vez que estirpes de crescimento ácido geralmente são oriundas de solos mais ácidos e menos férteis, ao contrario das estirpes de crescimento alcalino (Bushby e Marshall, 1977).

Tabela 1. Características culturais dos gêneros de rizóbios em meio de cultura 79.

Gênero	Forma da Colônia	TACI	pH	Diâmetro da colônia(mm)	Produção de PSE	Crescimento
<i>Rhizobium</i>	Circulares , convexas	2 a 3	Ácido	>2	intensa , translúcidas e muscilaginosas	Rápido
<i>Sinorhizobium</i>	Circulares , convexas	2 a 3	Ácido	>2	intensa , translúcidas e muscilaginosas	Rápido
<i>Mesorhizobium</i>	Circulares , convexas	3 a 5	ácido a neutro	>2	intensa , translúcidas e muscilaginosas	Rápido a Intermediário
<i>Allorhizobium</i>	Circulares , convexas	1 a 2	ácido a neutro	Entre 1 e 2	intensa , translúcidas e muscilaginosas	Rápido
<i>Azorhizobium</i>	Circulares	3 a 4	Alcalino	<1	Pouca – menos que <i>Bradyrhizobium</i>	Rápido a Intermediário
<i>Bradyrhizobium</i>	Circulares,convexas, textura granular	6 a 10	Alcalino	<1	Pouca a abundante - opaca, pouco translúcida	Lento a muito Lento

Fonte: Microbiologia e bioquímica do solo (Moreira e Siqueira, 2006).

O diâmetro das colônias dos isolados que nodulam leguminosas é um parâmetro que apresenta correlação com outras características culturais. Colônias com diâmetro menor que 1 mm possuem superfície seca ou pouca produção de polissacarídeos, e colônias maiores tendem a produzir mais goma (Martins et al., 1997).

A produção de exopolissacarídeos agrupa as bactérias em secas, quando não produzem muco, e butírica quando produzem muco. Estirpes de crescimento rápido tendem a produzir mais muco, ao contrário de rizóbios de crescimento lento que formam colônias secas com baixa produção de muco (Martins et al., 1997). Segundo Bushby e Marshall, (1977) assim como pH essas características podem revelar informações importantes, estirpes de *Rhizobium ssp.*, geralmente produzem mais muco em meio sólido que estirpes de *Bradyrhizobium ssp.*, podem também estar associadas a resistência à estresse ambientais uma vez que o muco pode formar uma proteção a elevadas temperaturas a colônia de rizóbio (Hollingsworth et al., 1985).

Outras características fenotípicas podem avaliar melhor os isolados e obter mais informações a respeito da sua ecologia e fisiologia, tais como, a capacidade de crescimento em diferentes pH, concentrações de sais, temperatura são utilizados na caracterização “*in vitro*” como também na correlação com condições ambientais (Swellim et al., 1997; Sá et al., 1993; Xavier et al., 1998).

As características morfofisiológicas dos rizóbios é o primeiro passo para identificação de grupos taxonômicos, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. São informações oportunas, uma vez que permitem um esboço da diversidade de espécies e dão base ao conhecimento e possibilitam a continuidade dos estudos das estirpes identificadas, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (Pelczar et al., 1997).

2.5 Leguminosas Forrageiras

Entre as famílias mais representativas da flora no mundo, a *Leguminosae* (*Fabaceae*) é uma das mais expressivas, pela fixação de nitrogênio no solo e seu repasse ao agroecossistema, presença em vários sistemas agrícolas, pela sua agressividade na dispersão de sementes e relevante potencial para a pecuária, na formação de legumineiras e para pastejo, seja em pastagens consorciadas com gramínea, seja como banco de proteínas (Pequeno et al., 2002).

As espécies de *Leguminosae* estão completamente inseridas na cultura da população rural da Caatinga, sendo utilizadas como alimento, lenha, forragens, produtos

medicinais (Queiroz, 2009), indicando ser esse grupo de plantas uma fonte significativa de recursos naturais, especialmente para os habitantes do semiárido.

Na região do semiárido, que ocupa grande parte da região nordeste do Brasil e tem como principal fator limitante o déficit hídrico, onde predominam agricultura de subsistência e a pecuária extensiva as leguminosas representam uma das famílias dominantes, formando um dos principais recursos naturais da flora nativa que apresentam uma série de características que a credenciam como uma importante fonte de alimento para o gado (Sépulveda, 2005; Caldas Pinto et al., 2006).

Essas leguminosas possuem características particularmente atrativas para serem usadas nos sistemas silvipastoris, especialmente no que se refere à fixação simbiótica de nitrogênio (Garcia, 1986; Auer e Silva, 1992; Barberi *et al.*, 1998) e a deposição de matéria orgânica com alto conteúdo de nitrogênio ao solo. Nesse sentido, a incorporação de espécies fixadoras de nitrogênio pode assegurar diversidade, estabilidade e continuidade aos sistemas de forragens (Gutteridge, 1998), promovendo incrementos na produção animal, pelo aumento da qualidade e quantidade da forragem em oferta, resultante não só da participação da dieta do animal, mas também dos efeitos indiretos relacionados, à FBN e seu repasse ao ecossistema de pastagem.

Nesse contexto, as leguminosas representam valores expressivos de riqueza e diversidade a ser explorada.

2.5.1 Feijão de rolinha

O feijão-de-rola (*Macroptilium lathyroides*) é uma trepadeira anual com hábito de crescimento indeterminado que chega a medir até 1,5 m, da família das leguminosas, subfamília papilionoídea. Tal espécie possui flores vermelho-violáceas ou azul-violáceas, intensa deiscência de vagens maduras e uma planta indiferente ao fotoperíodo, nativa das Guianas, Brasil e Paraguai, cultivada como forragem e adubo verde. Também é conhecida pelo nome de feijão-de-pombinha.

Muito utilizado como planta forrageira no sul do Brasil, o feijão-de-rolinha é adaptada às condições edafoclimáticas do Semiárido nordestino deste país. Essa leguminosa é pouco exigente em fertilidade, vegetando em locais mal drenados, de baixo pH e adaptada a precipitações anuais de 475 a 3.000 mm (Skerman et al., 1998).

Skerman et al. (1988) ressaltaram que o feijão-de-rola é uma espécie que apresenta regeneração pelo banco de sementes do solo e rebrotação após a colheita de sementes da primeira floração, o que possibilita, quando as condições climáticas são

favoráveis, a obtenção de uma segunda colheita de sementes. Estes mesmos autores observaram, também, que esta leguminosa apresenta altos rendimentos de forragem.

2.5.1 Jureminha

A jureminha (*Desmanthus virgatus*) é uma leguminosa pertencente à subfamília *Mimosoideae*, é uma planta subarborescente perene de ramificações em sua base, possui altura de 3 a 4 m e 3 a 10 mm de diâmetro basal, inflorescência axilar, de vagens estreitas e lineares, talos esbeltos, angulares e expressivos. As raízes são penetrantes, persistentes e devido à formação de xilopódios, órgãos armazenadores de água e nutrientes, tem grande resistência à seca (Alcântara e Bufarah, 2004), com uma ampla distribuição em todo o continente americano, sendo encontrada desde o Texas até América do Sul (Forlin et al., 2000)

Usada para forragem e pasto, possui alta palatabilidade, elevada taxa de crescimento e resiste ao corte e pastejo. Sua rusticidade, agressividade e persistência permitem pastejo direto, podendo ser utilizada para formação de legumineiras, banco de proteínas ou em consórcio com gramíneas. Rica em minerais e proteína, não apresenta princípio tóxico para os animais (Figueiredo et al., 2000b). É tolerante a regiões semi-áridas adaptando-se a índices pluviométricos entre 250-1.500 mm. Pode ser usada tanto pelos melhoristas de forrageiras para melhoria das pastagens (Aragão e Martins, 1996).

As plantas podem ser cortadas para a alimentação animal até 4 vezes/ano e apresentam um rendimento em média de 35 tons/ha/ano de matéria seca. Há pouca mortalidade até pelo menos o quarto ano (Skerman et al., 1991).

O valor nutricional da jureminha fica entre 24-30% de proteína em matéria seca (Gutteridge e Shelton, 1994). Suas características nutritivas permitem sugerir o seu uso no arraçamento do rebanho durante o período de estiagem, de forma a garantir a manutenção dos animais (Figueiredo et al., 2000a). Dessa forma, Kharat et al. (1980), obtiveram valores de 35,80; 13,05; 7,02; 53,18 e 41,55 %, respectivamente para MS, PB, MO, MM, FDN e FDA. Estudando a caracterização químico-bromatológica de *D. virgatus* no brejo paraibano, Figueiredo et al. (2000b) obtiveram valores de MS, PB, MO, MM, FDN e FDA de 31,79; 17,00; 92,52; 7,47; 36,01 e 28,98 % para 395 dias de crescimento e de 27,72; 20,20; 92,65; 7,38; 40,28 e 26,67% para 72 dias de rebrota. Demonstrando assim, características que lhe qualificam com uma planta forrageira com potencial produtivo e qualitativo, em especial para o Semiárido.

Segundo Dornelas (2003), a jureminha apresenta grande potencial para arraçoamento dos ruminantes no período de estiagem a proporcionar máxima produção de massa microbiana. E o feno destaca-se apresentando ótimo valor nutritivo, entre 24-30% de proteína em matéria seca e valor forrageiro de 35,80; 13,05; 82,21; 7,02; 53,18 e 41,55 %, respectivamente (MS), (PB), (MO), (MM), (FDN) e (FDA). Suas características nutritivas permitem sugerir o seu uso no arraçoamento do rebanho durante o período de estiagem, de forma a garantir a manutenção dos animais (Figueiredo et al., 2000a; Lewis e Schire, 2003).

A espécie *Desmanthus virgatus* tem sido considerada de grande interesse como fonte de leguminosas forrageiras para os trópicos semi-áridos (National Academy of Science, 1978; Burt, 1993), principalmente por forma uma simbiose eficiente com as bactérias fixadoras de nitrogênio tornando-o nitrogênio atmosférico disponível às plantas, proporcionando rápida cobertura vegetal favorecendo a fauna de solo impedindo o desenvolvimento de vegetação espontânea.

2.5.3 Jurema Branca

A jurema branca (*Mimosa artemisiana*) é uma planta da família *Mimosaceae*, de porte arbóreo pequeno com cerca de 2-4m de altura, com casca castanho-claro, fortemente armada por acúleos vigorosos. Possui folhas alternas, compostas, folíolos verde-claros, foscos, oblongos e flores em espigas possuem de 4-8cm de comprimento, de cor alva. Seu fruto é uma vagem de cor castanho-pálido, com 8-12cm de comprimento, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes. É uma planta caducifólia e sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até a estação seca. Contém 2-12 sementes pequenas, ovais de cor marrom por vagem. Essa leguminosa pode ser utilizada como forragem (Maia, 2004).

Planta que ocorre na caatinga, do Piauí até a Bahia, do tipo “arbórea densa” até a “arbustiva rala”, a jurema branca é uma planta pioneira que facilmente ocupa capoeiras e beiras de estrada, é tolerante a elevados níveis de perturbação da vegetação e é uma árvore com capacidade de fixar nitrogênio no solo através de simbiose com bactérias na sua raiz. É uma planta caducifólia e sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até a estação seca (Maia, 2004).

Com relação à composição química segundo Bezerra et al. (2011), verificou a jurema-branca, e os valores encontrados foram de 93,31; 4,81; 8,81; 72 e 4,4% para Matéria Seca, Matéria Mineral, Proteína Bruta, Fibra em Detergente Neutro e Energia Bruta, respectivamente.

2.5.4 Jurema Preta

Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), arvoreta ricamente aculeada, de 4-6 metros de altura, dotada de copa irregular, cujos ramos novos apresentam pêlos viscosos. Típica das áreas semi-áridas do Brasil, a jurema preta pertence à família *Mimosaceae* (Cronquist, 1981). É uma arvoreta de 5 a 7 m de altura, de porte arbustivo, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante, desprendendo-se em porções delgadas escamiformes e ramos castanho-avermelhados, esparsamente aculeados. Apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa. (Oliveira et al., 1999).

E típica das áreas semi-áridas dos estados do Nordeste do Brasil (Piauí até a Bahia) (Lima, 1996; Oliveira et al., 1999; Maia, 2004), e no México (Maia, 2004). A jurema preta possui grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos, é uma espécie indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e sua tendência ao longo do processo é de redução da densidade. No início da sucessão formam matas quase puras, seus folíolos caem e se refazem continuamente cobrindo o solo com uma tênue camada que se decompõe formando ligeiras camadas de húmus e participa também da recuperação do teor de nitrogênio do solo. Preparando, dessa forma, o solo para o aparecimento de outras plantas mais exigentes (Maia, 2004).

Em seu habitat natural, a jurema-preta tem sido explorada para produção de estacas e lenha, segundo Faria (1984), seu caule é excelente fornecedor de madeira, especialmente para a geração de calor, pois dela se conseguem temperaturas mais elevadas. Além da utilização pelos caprinos, ovinos e bovinos que têm nessa planta, verde ou fenada, um importante componente de suas dietas, especialmente pastejando as rebrotas mais jovens no início das chuvas, bem como as folhas e vagens secas durante o período de estiagem (Pereira Filho et al., 2005).

Devido à sua importância como forrageira no semi-árido nordestino, estudos sobre a *Mimosa tenuiflora* têm sido mais direcionados para seu valor nutricional bem como ao seu caráter tóxico, fatores que interferem diretamente na produtividade animal.

A jurema preta é uma das espécies mais utilizadas para obtenção de forragem na pecuária extensiva. É possível obter anualmente mais de 1500 kg de MS/ha, provenientes da coleta das folhas e ramos finos de jurema preta (Araújo Filho e Vasconcelos, 1983; Pereira Filho et al., 1999; Vasconcelos e Araújo Filho, 1985). Os frutos da jurema preta também podem constituir uma fonte de alimento para os animais. Estimativas indicam um potencial de produção anual de frutos entre 3000 e 4000 kg/ha (94,4% de MS), dos quais aproximadamente a metade é constituída de sementes, as quais apresentam, na base da matéria seca, 29% de proteína bruta (PB), sendo 54,24% digeríveis pelos animais. Sendo uma importante forrageira para caprinos nos períodos secos do Cariri paraibano, participando com 22,4% da dieta de animais fistulados (Leite e Viana, 1986).

Com relação a composição química, Vasconcelos (1997), citado por Pereira Filho et al. (2003), trabalhando com feno de jurema-preta obtido no período chuvoso (março e abril) e de estiagem (setembro e outubro), verificou para matéria seca (MS) teores de 90,0 e 90,9%; proteína bruta (PB) de 15,1 e 13,5%; fibra em detergente neutro (FDN) de 35,1 e 36,2%; fibra em detergente ácido (FDA) de 16,0 e 15,7%; e tanino de 26,6 e 16,9%, respectivamente. Em trabalho realizado em Pernambuco com três espécies de pastagens arbustivas e arbóreas da Caatinga, dentre elas a jurema preta, Almeida et al. (2006) encontraram valores médios para MS, PB, FDN e FDA das folhas de jurema preta colhidas no período seco de 47,62; 14,82; 46,38; 33,04 respectivamente e, no período chuvoso de 47,52; 14,41; 46,33; 32,36 quando avaliaram espécies arbóreas e arbustivas de pastagens, comparando seus valores nutricionais na época seca e chuvosa.

Apesar das limitações da qualidade da jurema preta como forrageira e devido à escassez de material forrageiro de boa qualidade durante a maior parte do ano na região Semiárida, é interessante que se consiga uma maneira de melhorar a qualidade do volumoso que se apresenta abundante nas copas dessa espécie, como, por exemplo, tratando-se essa forragem com Polietilenoglicol (PEG) (Beelen *et al.*, 2003) ou NaOH (Pereira Filho *et al.*, 2001, 2003). A ingestão de forragem de jurema preta tratada com essas substâncias aumenta significativamente, pois parte dos taninos é neutralizada e a sua degradabilidade aumenta, uma vez que os constituintes da parede celular são quimicamente atacados, facilitando a digestão da celulose e lignina.

Apesar da sua importância como forrageira, a jurema preta também faz parte do grupo de plantas tóxicas. Há relatos na literatura da ocorrência de defeitos congênitos

em bovinos e, mais freqüentemente, caprinos e ovinos provocados pela ingestão de jurema preta durante a gestação. Segundo Riet-Corrêa et al. (2006) outras podem ser as causas de malformações congênitas, porém a alta freqüência da doença no Semiárido e sua reprodução experimental mediante a administração de jurema preta sugerem que a maioria das malformações é causada pela ingestão desta planta. Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido e não há tratamento específico, é importante evitar o acesso dos ovinos e caprinos à áreas com jurema, principalmente, fêmeas, nos primeiros 60 dias de gestação.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, P. B.; Bufarah, G. Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas. São Paulo: Nobel, p. 150, 2004.
- Allen, O. N.; Allen, E. K. The leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation. Wisconsin, University of Wisconsin Press. p. 812, 1981.
- Almeida, A. C. S.; Ferreira, R. L. C., Santos, M. V. F.; Silva, J. A. A.; Lira, M. A.; Guim, A. Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum:Animal Sciences**. v. 28, n. 1, p. 1- 9, 2006.
- Araújo, E. L.; Silva, S. I.; Ferraz, E. M. N. Herbáceas da caatinga de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.(Orgs) Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, p. 183-187. 2002.
- Araujo Filho, J. A de; Vasconcelos, S. H. L. Efeitos da intensidade e intervalo da poda sobre a produção de matéria seca da jurema preta (*Mimosa sp*). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, XX. 1983. Pelotas. Anais... Pelotas: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p. 312.
- Aragão, W. M.; Martins, P. S. Jureminha (*Desmanthus virgatus* L.): Uma leguminosa forrageira promissora. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 40, 1996. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 5.
- Auer, C. G; Silva, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOZO, E.J.B.N. et al. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, p. 157- 169, 1992.
- Bala, A.; Murphy, P. J.; Osunde, A. O.; Giller, K.E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v.22, p.211- 223, 2003.
- Barberi, A.; Carneiro, M. A. C.; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. Lavras-MG, CERNE, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.
- Beelen, P. M. G.; Berchielli, T. T.; Oliveira, S. G.; Medeiros, A. N.; Araújo Filho, J. A.; Pereira Filho, J. M. Influência dos taninos condensados sobre a degradabilidade ruminal de jurema preta (*Mimosa hostilis*), sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e mororó (*Bauhinia cheilantha*). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, XL Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p. 1-3. 2003.

- Bezerra, D. A. C.; Rodrigues, F. F. G.; Costa, J. G. M.; Pereira, A. V.; Sousa, E. O.; Rodrigues, O. G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret E *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, vol. 33, n. 1, p. 99-106, 2011.
- Bezerra, R. V. Biodiversidade e efetividade de rizóbios nativos de solos do semi-árido de Pernambuco em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) / Rosemberg de Vasconcelos Bezerra, 2009.
- Bouhmouch, I.; Souad-mouhsine, B.; Brhada, F., Aurag, J. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1103-1113, 2004.
- Bull, A. T; Goodfellow, M.; Slater, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 219-252, 1992.
- Burt, R. L. *Desmanthus*: a tropical and subtropical forage legume: part 2. Artificial key and specie descriptions. **Herbage Abstracts**. Australian, v. 63, p. 473-478, 1993.
- Burris, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotecnology**, v. 22, p.381-393, 1999.
- Bushby, H. N. A.; Marshall, K. C. Some factors affecting the survival of root nodule bactéria on dessication. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, p.143-147, 1977.
- Caldas Pinto, M. S.; Borges Cavalcante, M. A.; Andrade, M. V. M. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v.7, nº. 04. Disponível no site: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>, 2006.
- Carvalho, M. M.; Xavier, D. F.; Alvim, M. J. Arborização melhora a fertilidade do solo em pastagens cultivadas. Comunicado Técnico. Embrapa Gado de Leite. v. 29, p.4 , 2003.
- Carvalho, M. A. C.; Arf, O.; Sá, M. E.; Buzetti, S.; Santos, N. C. B.; Bassan, D. A. Z. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 25, p 617-624, 2001.

- Costa, C. G. F. Caracterização fenotípica de rizóbios de solo rizosférico de leguminosas nativas do semi-árido cearense Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, 2010.
- Crawford, N. M.; Glass, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plant. **Trends in plant science**, v.3, n.10, p. 389-395, 1998.
- Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plant. New York: Columbia University, 1981.
- Dakora, F. D.; Keya, S. O. Nitrogen fixation in sustainable agriculture: the African experience. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 809-818, 1997.
- Dellaglio, F.; Felis G. E.; Germond, J. Should names reflect the evolution of bacterial species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 279-81, 2004.
- Denison, R. F.; Kiers, E. T. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes and Infection*. **Agronomy and Range Science**. University of California,, v. 6, p. 1235-239, 2004.
- Dornellas, C. S. M. Cinética ruminal em caprinos de forrageiras nativas da Caatinga, 2003, 58f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2003.
- Faria, S. M.; Franco, A. A.; Jesus, R. M.; Menandro, M. de S.; Baitello, J. B.; Mucci, E. S. F.; Dobereiner, J.; Sprent, J.I. New nodulating legume trees from southeast Brazil. **New Phytologist**, 98: p. 317-328, 1984.
- Faria, W. L. F. A jurema preta (*Mimosa hostilis* Benth) como fonte energética do Semiárido do nordeste – carvão. 114 f. (Dissertação – Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1984.
- Faria, S. M.; Lima, H. C.; Franco, J. B.; Mucci, E. S. F.; Sprent, J. I. Nodulation of legume trees from southeast Brazil. **Plant and Soil**, 99: p. 347-356, 1987.
- Faria, S. M.; Lewis, G. P.; Sprent, J. I.; Sutherland, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, 111: p. 607-619, 1989.
- Faria, S. M.; Lima, H. C.; Carvalho, A. M.; Gonçalves, V. F.; Sprent, J.I. Occurrence of nodulation in legume species from Bahia, Minas Gerais and Espírito Santo States of Brazil. In: SPRENT, J.I.; McMEY, D. (Eds) **Advances in Legume Systematics 5. The nitrogen factor**. Royal Botanic Gardens, p. 17-23, 1994.

- Ferguson, B. J.; Mathesius, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 47-72, Sep. 2003.
- Figueiredo, M. V.; Guim, A.; Pimenta Filho, E. C.; Sarmiento, J. L. R.; Andrade, M. V. M.; Pinto, M. S. C.; Lima, J. A. Avaliação da composição bromatológica e digestibilidade "in vitro" do feno de *Desmanthus virgatus*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37. Viçosa-MG, Anais... UFV-Viçosa, p.29, 2000a.
- Figueiredo, M. V.; Pimenta Filho, E. C.; Guim, A.; Sarmiento, J. L. R.; Andrade, M. V. M.; Pinto, M. S. C. Estudo descritivo de *Desmanthus virgatus*: uma revisão. In: Congresso Nordestino de Produção Animal, 2., Teresina-PI, Anais... SNPA - Teresina, p.341-344, 2000b.
- Forlin, S. M.; Rey, H. Y.; Mroginski, L. A. Cultivo de tejidos de *Desmanthus virgatus*: obtención de plantas a partir de hojas. Argentina: IBONE; Facultad de Ciências Agrárias, 2000. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas)
- Franco A. A.; Neves, M. C. P. Fatores limitantes a fixação biológica de nitrogênio. In: Cardoso, E. J. B. N.; Tai, S. M.; Neves, M. C. P. ed. Microbiologia do Solo. Campinas. SBCS, p. 219-230, 1992.
- Freire, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa. In: Cardoso, E. J. B. N.; Neves, M. C. P., Eds Microbiologia do Solo. Campinas-SP: SBCS, p. 121-140, 1992.
- Freitas, A. D. S.; Sampaio, E. V. S. B.; Santos, C. E. R. S.; Silva, A. F.; Lyra, M. C. C. P. Nodulação em leguminosas da Caatinga. CETENE, Recife-PE, 2010. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/1021a.pdf>>. Acesso em: outubro de 2011.
- Garcia, R. Banco de proteína. In: Peixoto, A.M. et al. (Ed.). Congresso Brasileiro de Pastagens, 8. Piracicaba, Anais... Piracicaba: FEALQ, 1986. p. 79-99, 1986.
- Giongo, A.; Ambrosini, A.; Vargas, L.K.; Freire, J.R.J.; Bodanesezanettini, M.H.; Passaglia, L.M.P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. Agriculture, ecosystems & environment. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n.3, p. 261-269, 2008.
- Gutteridge, R. C. The potencial of nitrogen fixing trees in livestock production systems. In: International Workshop, Morrilton. Proceeding. Morrilton: Nitrogen Fixing Trees for Fodder Production, p. 1-16,1998.

- Gutteridge, R. C.; Shelton, H. M. Forage tree legumes in tropical agriculture. The Tropical Grassland Society of Australia Jacob, J. P., 2007. Evaluation of Illinois bundleflower (*Desmanthus illinoensis*) for broiler chicks. *J. Appl. Poult. Res.*, v.16, p. 39-44, 1994.
- Hirsch, A. M.; Lum, M. R.; Downie, J. A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p. 1484-1492, 2001.
- Hungria, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Org.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, DF: EMBRAPASPI, p.45-61, 1994.
- Hungria, M.; Vargas, M. A. T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- Hollingsworth, R.; Smith, E.; Ahmad, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.142, p.18-20, 1985.
- Kharat, S. T.; Prasad, V. J.; Sobales, B. N.; Sane, N. S.; Joshi, A. L.; Angnekar, D. V. Note on comparative evaluation of *Leucaena leucocephala*, *Desmanthus virgatus* e *Medicago sativa* for cattle. **Indian Jour. of Animal Sci**, v.50, p.638-639, 1980.
- Keyser, H. H.; Somasegaran, P.; Bohlool, B.B. Rizobial Ecology and Technology. In: Metting Jr. F.B. (ed.) **Soil Microbial Ecology**, New York: Dekker, p. 205-206, 1997.
- Lewis, G. P.; Schire, B. D. Leguminosae or fabaceae? In: Klitgaard, B. B.; Bruneau, A. Advances in legume systematics. **Kew Bulletin**: Royal Botanic Gardens, Iglaterra, p.1-3, 2003.
- Leite, E. R.; Viana, J. J. Avaliação do potencial forrageiro nos Cariris paraibanos. In: XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Campo Grande. Anais... Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p.229, 1986
- Lima, J. L. S. Plantas forrageiras das Caatingas – usos e potencialidades. EMBRAPA-CPASA/PNE/RB-KEW. Petrolina. p. 43, 1996.
- Lira Junior, M. D. E A.; Lima, A. S. T.; Arruda, J.R.F.; Smith, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. **Soil Biology & Biochemistry**, p 235–239, 2004.
- Lombardi, M. L. C. O. Diversidade de rizóbios nativos de solos do Estado de São Paulo. (Tese Doutorado) Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 164, 1995.

- Lodeiro, A. R.; González, P.; Hernández, A.; Balagué, L.J.; Davelukes, G. Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grow common beans. **Plant Science**, v. 154, p. 31-41, 2000.
- Maia, G. N. Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246, 2004.
- Martins, L. M.. U. Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**. v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.
- Melloni, R.; Moreira, F. M. S.; Nóbrega, R. S. A.; Siqueira, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p. 235- 246, 2006.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 729, 2006.
- Moreira, F. S. M.; Siqueira J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p. 626, 2002.
- Moreira, F. M. S. Fixação biologia do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAUJO, R.S., HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994.
- Moreira, F. M. S.; Silva, M.F.; Faria, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist.**, 121: p. 563-570, 1992.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Tropical Iqumea **rtouries** for the future. Washington: National Academy Preis. p.128, 1978.
- Nandal, K.; Sehrawat, A. R.; Yadav, A. S.; Vashishat, R. K.; Boora, K. S. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*). **Microbiological Research**, p. 367-373, 2005.
- Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. p. 15-60. In I. S. Melo & J. L. Azevedo (Ed.). Ecologia microbiana. Embrapa- CNPMA, Jaguariúna, p. 486, 1998.
- Oliveira, M. R.; Rodrigues, J. M. E.; Chiavone-Filho, O.; Medeiros, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia** v.14 – pp. 93-104, 1999.

- Oliveira, F. L.; Pitard, R. M.; Souto, S. M. Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas *Arachis pintoi* e *Cratylia argentea*. Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. p. 19, 1998. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 53).
- Pequeno, P. L. L.; Vasconcelos, L. P.; Vieira, A. H.; Martins, E. P. Benefícios do uso de leguminosas em solos com atividade alta de argila. 2002. Disponível em: <http://www.arvore.com.br/artigos/htm_2002/ar0608_1.htm>. Acesso em: outubro de 2010.
- Pelczar, M. J. JR.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, 2.ed. v.2, 1997.
- Peoples, M. B. D.; Herridge, D. F. Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. **Advances in Agronomy**, New York, v.44, p.223-255, 1990.
- Pereira Filho, J. M.; Amorim, O. S.; Vieira, E. L.; Silva, A. M. de A.; César, M. F.; Maia, J. C.; Sousa, I. S. Efeito da altura de corte sobre a produção de matéria seca e proteína bruta da jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Wild.). In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Porto Alegre: Anais... Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p. 24, 1999.
- Pereira Filho, J. M.; Amorim, O. S.; Vieira, E. L.; Silva, A. M. A.; Cezar, M. F.; Amorim, F. U.; Sousa, I. S. Efeito do tratamento químico com hidróxido de sódio sobre a degradabilidade *in situ* da FDN e da PB do feno de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Wild) In: Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal - XVII ALPA, Havana. **Anais...** Havana. v.9, p.1-3, 2001.
- Pereira Filho, J. M.; Vieira, E. L.; Silva, A. M. A.; César, M. F.; Amorim, F. U. Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*, Wild). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32 n. 1. p.70-76. 2003.
- Pereira Filho J. M.; Vieira E. L.; Kamalak A.; Silva A. M. A.; Cezar M. F. E.; Beelen P. M. G. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**. v.17, art.91., 2005. Disponível em: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17>. 2010.
- Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

- Polhill, R. M. Classification of the Leguminosae. In: BISBY, F.A.; Buckingham, J.; Harbone, J.B. **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**. New York: Chapman & Hall, p.35-50, 1994.
- Queiroz, L. P. Distribuição das espécies de Leguminosae na Caatinga. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; Giulietti, A.M.; Virgínio, J.; Gamarra-Rojas, C. **Vegetação e flora da Caatinga**. APNE/CNIP, Recife, PE, p. 141-153, 2002.
- Queiroz, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, p. 467, 2009.
- Riet-Correa, F.; Medeiros R. M. T.; Dantas A. F. M. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB. Ed. SEBRAE/PB. p. 58, 2006.
- Rosenblueth, M.; Martinez-Romero, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant and Microorganisms Interactions**, v.8, p. 827-837, 2006.
- Sá, N. M. H. et al. Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista de Microbiologia**, v. 24, n. 1, p. 28-48, 1993.
- Sá, M. H.; Vargas, M. A. T. Fixação biológica do nitrogênio por leguminosas forrageiras. In: Vargas, M. A. T.; Hungria, M. (Eds). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa – CPAC, p. 127-152, 1997.
- Santos, D. R.; Costa, M. C.; Miranda, J. R. P.; Santos, R.V. Micorriza e rizóbio no crescimento e nutrição em N e P de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan.). **Revista Caatinga** (Mossoró), v.21, n.1, p.76-78, 2008.
- Sawada, H. L. D.; Kuykendall, D.; Young, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen fixing legume symbionts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p.155-179, 2003.
- Sepúlveda, S. Desenvolvimento microrregional sustentável: métodos pra planejamento local. Brasília, DF: IICA, p. 295, 2005.
- Sharma, S.; Aneja, M. K.; Mayer, J.; Munch, J. C.; Schloter, M. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. **Applied Environment Microbiology**. v. 71, p.2001-2007, 2006.
- Silveira, J. A. G.; Costa, R. C. L.; Oliveira, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.

- Slattery., J. F.; Pearce, D. J.; Slattery, W. J. Effects of resident rhizobial communities and soil type on the effective nodulation of pulse legumes. **Soil Biology & Biochemistry**. Department of Primary Industries, Rutherglen Research Institute, Rutherglen, Vic. 3685, Australia. v.36, p. 1339–1346, 2004.
- Skerman P. J.; Cameron D. G.; Riveros F. Tropical forage legumes. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO. p. 692, 1988
- Sprent, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- Sprent, J. I. Nodulation in Legumes. **Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 146, 2001.
- Swelim, D. M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, n.3, p.224-232, 1997.
- Souza, L. A. G.; Silva. M. F.; Moreira, F. W. Capacidade de nodulação em cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.24, p. 9-18, 1994.
- Straliotto, R.; Rumjanek, N. G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.70, 1999. (Documentos 93)
- Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. p. 719, 2004.
- Tan, I. K. P.; Broughton, W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, p. 389-393, 1981.
- Teixeira, F. C. P.; Reinert, F.; Rumjanek, N. G.; Boddey, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the ¹⁵N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**. p. 1989–1993, 2006.
- Toro, N. Nodulation competitiveness in Rhizobium-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 157-162, 1996.
- Vallis, I.; Gardener, C. J. Effect of pasture age on the efficiency of nitrogen fixation by 10 accessions of *Stylosanthes* spp. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.25, p.70-75, 1985.
- Vargas, M. S. U. Avaliação da contribuição da fixação biológica de N₂ em várias leguminosas forrageiras e transferência de N para uma gramínea consorciada. Itaguaí: UFRRJ, p. 138, 1991. Tese de Mestrado.

- Vargas, M. A. T.; Hungria, M. *Biologia dos solos dos cerrado*. Planaltina: EMBRAPAC/PAC. p. 524, 1997.
- Vasconcelos, S. H. L.; Araújo Filho, J.A. Influência da frequência e intensidade de poda sobre a produtividade da jurema preta (*Mimosa* sp.) **Caatinga**, v. 5. n. 1/2. p. 27-34. 1985.
- Vasconcelos, V. R. Caracterização química e degradação de forrageiras do semi-árido brasileiro no rumem de caprinos. 1997. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Vincent, J. M. *A Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, p.164,1970.
- Weir, B. S. The current taxonomy of rhizobia, 2009. Disponível em : New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Acesso em julho de 2010.
- Weir, B. S. The current taxonomy of rizobia, 2006. Disponível em: www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html. Acesso em outubro de 2010
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin,v.27, p.386-392, 1998.
- Zahran, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Botany Department, Faculty of Science, Beni-Suef .v. 91, p.143–153, 2001.
- Zilli, J. L. E. Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas do cerrado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p.137, 2001. Dissertação Mestrado.

Capítulo II

Caracterização morfológica de isolados de rizóbios obtidos de nódulos de leguminosas com potencial forrageiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PAULO,P.F.M. Caracterização morfológica de isolados de rizóbios obtidos de leguminosas com potencial forrageiro. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. UFPB. Areia-PB. Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade.

RESUMO:

A simbiose rizóbio-leguminosa é de grande importância devido o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), fundamental para a ciclagem de nutrientes e uma alternativa viável para sistemas agropecuários no Semiárido. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente isolado de rizóbios das leguminosas feijão de rolinha (*Macroptilium lathyroides*), jureminha (*Desmanthus pernambucanus*), jurema branca (*Mimosa artemisiana*) e jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) com potencial forrageiro do Semiárido paraibano. Os isolados foram repicados em meio LMA para caracterização morfológica e os dados foram submetidos à análise de agrupamento para observação de similaridade. Todos os isolados apresentaram crescimento rápido e em sua maioria não modificaram o pH do meio de cultivo, a partir do coeficiente de Jaccard os isolados foi possível obter 35 grupos distintos mostrando uma enorme diversidade.

Palavras-chave: *Macroptilium lathyroides*, *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa artemisiana* e *Mimosa tenuiflora*.

ABSTRACT

The rhizobia-legume symbiosis is of great importance because the process of biological nitrogen fixation (BNF), essential for nutrient cycling and a viable alternative to agricultural systems in semi-arid. The objective of this study was to characterize morphologically isolated rhizobia of dove bean legumes (*Macroptilium lathyroides*), mimosa (*Desmanthus pernambucanus*), white jurema (*Mimosa artemisiana*) and black Jurema (*Mimosa tenuiflora*) with forage potential of Paraiba Semi-Arid. Isolates were transferred amid LMA for morphological characterization and the data were subjected to cluster analysis for observation of similarity. All isolates showed rapid growth and mostly did not change the pH of the culture medium from the Jaccard coefficient isolates was possible to obtain 35 different groups showing a huge diversity.

Keywords: *Macroptilium lathyroides*, *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa artemisiana* e *Mimosa tenuiflora*.

1- INTRODUÇÃO

As leguminosas representam uma das famílias dominantes na Caatinga, formando um dos principais recursos naturais da flora nativa e importante fonte de alimentação animal. Na região Semiárida paraibana, pequenos produtores utilizam espécies leguminosas nativas na alimentação animal. Segundo Seganfredo (1995) essas espécies são excelentes opções para o suprimento de nitrogênio a ser transformando em proteína, principalmente por ruminantes.

A abundância de espécies de leguminosas nessa região pode estar associada diretamente com a microbiota do solo, principalmente as bactérias nativas do gênero rizóbio. Essa simbiose pode beneficiar a manutenção da leguminosa em detrimento às demais famílias de plantas, por permitir a fixação biológica do nitrogênio, além de melhorar a fertilidade do solo rizosférico (Silveira et al., 2007).

Apesar da importância potencial da Fixação Biológica de Nitrogênio para as leguminosas forrageiras no Semiárido, poucos estudos tem sido feitos sobre o tema (Freitas et al., 2011) e as características dos microssimbiontes permanecem poucos estudadas.

O cultivo de leguminosas com essa simbiose seria uma alternativa mais viável para assegurar uma boa alimentação aos animais principalmente no período seco já que, são espécies mais resistentes aos períodos de estiagem, possui alto valor protéico, capacidade de rebrota, boa digestibilidade melhorando a qualidade da forragem e agressividade na colonização e na formação de banco de proteína.

O Nordeste Brasileiro é um centro de diversificação e distribuição das leguminosas forrageiras, porém este potencial permanece ainda pouco explorado no setor agropecuário pela falta de conhecimento das espécies que traduza as reais possibilidades de utilização (Aragão e Martins, 1996), tais como, a nodulação e contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

A caracterização morfofisiológica de colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes (Costa Junior, 2009). Dessa forma, é um passo fundamental para a identificação destes organismos, facilitando futuramente a classificação

taxonômica através da seleção de bactérias mais eficientes e adaptáveis a seu ambiente específico com pH e temperatura favorável ao seu desenvolvimento.

No presente estudo teve-se como objetivo o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios isolados de nódulos das espécies Feijão de rolinha, Jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta, bem como selecionar as estirpes com potencial para fixação biológica de nitrogênio.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Instituto Nacional do Semiárido e no Laboratório de Biotecnologia do Solo e da Água do Departamento de Solos e Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba no período de outubro de 2010 a setembro de 2011.

2.1 Obtenção dos Isolados Bacterianos

A região da pesquisa está inserida no Semiárido paraibano, caracterizado pela irregularidade de chuvas e longos períodos de estiagem. Assim, para execução da mesma foi necessário obter os nódulos de duas formas: diretamente no campo e cultivo de plantas isca em solo rizosférico da região (Embrapa, 1997).

2.1.1 Isolados obtidos no campo

As coletas no campo foram realizadas durante os períodos secos e chuvosos entre os meses de outubro de 2010 a abril de 2011, com a finalidade de coleta os nódulos radiculares diretamente na raiz das leguminosas em estudo.

O procedimento de coleta dos nódulos foi realizado de acordo com metodologia proposta por Hungria (1994), na qual as leguminosas foram amostradas em plena floração escolhidas de forma aleatória na área de estudo. A área para coleta dessas espécies está localizada na Estação Experimental do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), situada no Sítio Lucas, zona Oeste da cidade de Campina Grande - PB, Agreste paraibano, situada na parte oriental do Planalto da Borborema. O clima da região segundo Köppen é classificado como Bsh – semiárido quente com chuvas de verão.

Das leguminosas escolhidas para coleta de nódulos, o feijão de rolinha (*Macroptilium lathyroides*) é subarbustivo; a jureminha (*Desmanthus pernambucanus*) é arbustiva; as demais: jurema branca (*Mimosa artemisiana*) e jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) são arbóreas. Nas leguminosas subarbustivas e arbustivas, demarcou – se uma circunferência com raio de 15 cm ao redor da planta, correspondente a área do sistema radicular. Para as leguminosas arbóreas, foi necessário dois círculos, um de 15 e outro de 30 cm, e 20 cm de profundidade abrangendo parte o sistema radicular. A circunferência foi demarcada com o auxílio de uma pá de jardineiro e xibanca, cuidadosamente para não danificar os nódulos radiculares, em seguida a planta foi coletada, retirando-se o excesso de solo e a parte aérea (Figura 1).



Figura 1. Vista parcial da circunferência de coleta das raízes.

Os nódulos foram coletados diretamente do sistema radicular das leguminosas, em seguida foram preservados em sílica em gel, para posterior análise laboratorial (Figura 2).



Figura 2. Nódulos coletados da Jurema Preta coletados no campo e preservados em sílica em gel.

2.1.2 Isolados obtidos na casa de vegetação

As leguminosas foram cultivadas em estufa agrícola sob temperatura e luminosidade ambientais, em vasos com capacidade de 1 L, onde foram adicionados 0,75 kg de solo. Os vasos foram previamente esterilizados através da imersão em água sanitária por 30 minutos, em seguida lavados com água e secos ao ar.

O cultivo das leguminosas foi realizado em solo rizosférico coletado na região de estudo. Após a coleta, o mesmo foi transportado ao laboratório em caixas térmicas; destorroado, homogeneizado e passado em peneiras com malha de 2 mm.

Para o plantio das leguminosas foram utilizadas três sementes por vaso, previamente desinfetadas com álcool 70 % e enxaguadas com água destilada estéril (Embrapa, 1997), em seguida imersa em água quente (entre 80 e 90° C) para a quebra da dormência. Após

a emergência das plântulas foi efetuado o desbaste, sendo utilizada apenas uma planta para obtenção dos nódulos radiculares aproximadamente 60 dias após o plantio.

O protocolo para o cultivo de plantas isca (Embrapa, 1997), sugere irrigação com água estéril e uma vez por semana adição de solução de micronutriente ($1,0 \text{ mL kg}^{-1}$ de solo) isenta de nitrogênio (Franco e Dobereiner, 1967).

Ao término do cultivo foram coletados cinco nódulos radiculares por planta (Figura 3), que podem ser preservados por 12 meses em recipientes hermeticamente fechados contendo algodão e sílica gel.



Figura 3. Nódulos obtidos a partir de solo rizosférico do Feijão de rolinha.

2.2 Isolamentos de rizóbio

Os nódulos quinze nódulos de cada espécie escolhidos de forma aleatória foram desinfetados com álcool etílico 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e enxaguados abundantemente com água destilada estéril (Hungria, 1994), foram transferidos para tubos contendo um 1 mL de solução salina e esmagados com um bastão de vidro. O material foi riscado em placas contendo 15 mL do meio de cultura sólido LMA (“Levedura-Manitol-Agar”) com vermelho congo, pH ajustado para 6,8 (Figura 4); em seguida foi incubado por até dez dias a 28° C . O vermelho congo foi utilizado para facilitar a observação de contaminantes que absorveram a cor vermelha, uma vez que as colônias de rizobio não absorvem ou absorvem muito pouco a coloração vermelho congo. Os isolados que apresentarem contaminantes após a replicação foram novamente replicados até a purificação.



Figura 4. Riscagem e incubação dos isolados bacterianos.

Os isolados bacterianos inicialmente purificados foram utilizados para caracterização morfofisiológica. As mesmas estirpes foram repicadas em meio TY (Tripton-Levedura) contendo 15% de glicerol, para conservação em freezer, a -4°C (Embrapa, 1994).

2.3 Caracterização fenotípica

2.3.2 Tempo de crescimento para a visualização das colônias

Os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio LMA (Vincent, 1970) modificado pela a adição de 5 mL L^{-1} de solução de Vermelho Congo (Figura 5). Foi considerado crescimento muito rápido, para colônias visualizadas após um dia de incubação; rápido, para aquelas visualizadas de dois a três dias de incubação, intermediárias; com quatro a cinco dias; lentas, com seis a dez dias e muito lentas, visualizadas após dez dias de incubação (Melloni et al., 2006).



Figura 5. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de Vermelho Congo.

2.3.3 Forma e diâmetro das colônias

A forma e diâmetro das colônias foram determinados juntamente com o tempo de crescimento. Para o diâmetro as colônias foram classificadas como <1 mm, 1 a 2 mm e >2 mm. Quanto à forma foram classificadas como circular e irregular (Neder, 1992).

2.3.4 Borda e elevação da colônia

A borda e elevação da colônia foram determinados juntamente com o tempo de crescimento. Quanto à borda foi classificada como lisa, lacerado e ondulados. A elevação como achatadas ou convexas. (Neder, 1992).

2.3.5 Transparência da colônia

A transparência da colônia foi determinada juntamente com o tempo de crescimento, classificadas como sendo transparente, translúcida ou opaca (Hungria, 1994). As colônias que permitiram a passagem de luz foram classificadas como translúcidas e não permitiram a passagem de luz como opacos.

2.3.6 Produção de goma

A produção de goma (polissacarídeos) foi determinada juntamente com o diâmetro das colônias, após sete dias de incubação (Figura 6). Esta característica foi determinada visualmente em: sem produção de goma (escassa), pouca, moderada e abundante produção de goma (Melloni et al., 2006).

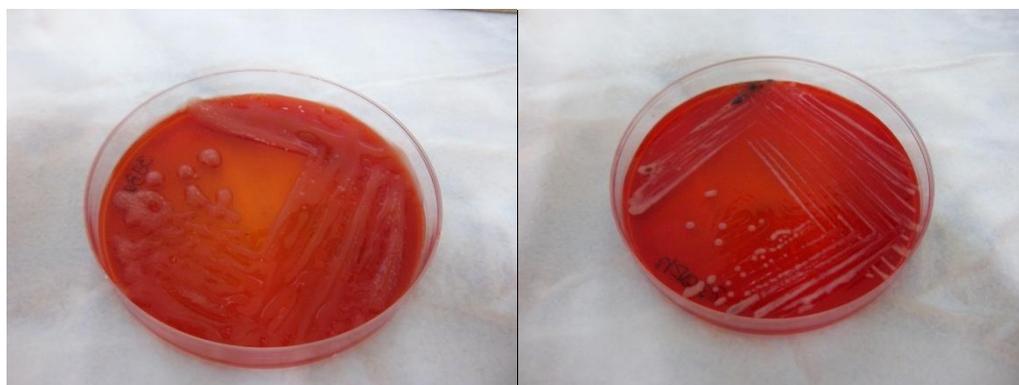


Figura 6. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de Vermelho Congo, com abundante e pouca produção de goma, respectivamente.

2.3.7 Coloração das colônias

A coloração das colônias foi determinada visualmente durante a determinação do diâmetro das colônias. Foram consideradas as cores: branca, creme, rosa, amarela ou incolor (Melloni et al., 2006).

2.3.8 Alteração do pH do meio

Os isolados foram inoculados em meio LMA (Vincent, 1970) modificado pela adição de 10 mL L^{-1} de Azul de Bromotimol (Figura 7). Os isolados acidificantes tornam o meio amarelo, os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura (Hungria, 1994). Os isolados foram comparados com placas sem inoculação.



Figura 7. Isolados crescidos em placas de Petri contendo meio LMA modificado pela a adição de solução de azul de bromotimol.

2.4 Identificações dos isolados

A partir das caracterizações morfológicas dos isolados, foi construída a matriz binária (presença e ausência da característica) no aplicativo Excel[®] do Office 2003. Essa matriz foi importada para o programa DendoUPGMA de acesso livre, para construção da matriz de similaridade utilizando-se o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908; Rohlt, 1997). A partir desta matriz foram construídos os dendogramas através do mesmo programa, utilizando-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Potencial de Nodulação

No período seco, apenas na jurema branca foi observada nodulação. No entanto, os nódulos coletados apresentavam tamanho reduzido e coloração interna esbranquiçada, que de acordo com Vidor et al., 1983 sugere inefetividade. A ausência dos nódulos em espécies nodulíferas pode estar relacionada com propriedades do solo (Barbieri et al., 1998; Fernandes et al., 2003), como altas temperaturas e baixa umidade.

No período chuvoso, as espécies apresentaram nodulação. Essas constatações também foram observadas por Allen e Allen (1981); Farias et al. (1989; 1994) e Freitas (2010), confirmando que a nodulação é frequente entre espécies Papilionoidea e Mimosoidea.

Avaliação das características morfológicas dos isolados das leguminosas em estudos crescidas em meio de cultura LMA.

O isolamento proporcionou a obtenção total de 560 isolados em meio de cultivo apropriado, a partir dos nódulos das quatro leguminosas em estudo, para cada leguminosa foram utilizadas cinco plantas, destas foram retirados 3 nódulos de cada planta totalizando 15 nódulos por planta, para obtenção dos isolados (Tabela 2).

Tabela 1. Número de isolados obtidos em leguminosas forrageiras da região Semiárida Paraibana.

Leguminosa forrageira	Número de plantas	Números de nódulos	Números de isolados
Feijão de Rolinha	5	15	108
Jureminha	5	15	168
Jurema Branca	5	15	197
Jurema Preta	5	15	87
		Total	560

Apesar das diversas limitações da técnica de caracterização cultural, esta pode ser considerada uma boa ferramenta para análise preliminar da diversidade de rizóbios (Zilli et al., 2003).

A maioria dos isolados obtidos apresentaram formação de colônias em até 3 dias de crescimento, caracterizando estirpes de crescimento rápido e intermediário, com

desenvolvimento entre 4 e 5 dias (Figura 8), sendo observado que 64% dos isolados apresentou crescimento rápido.

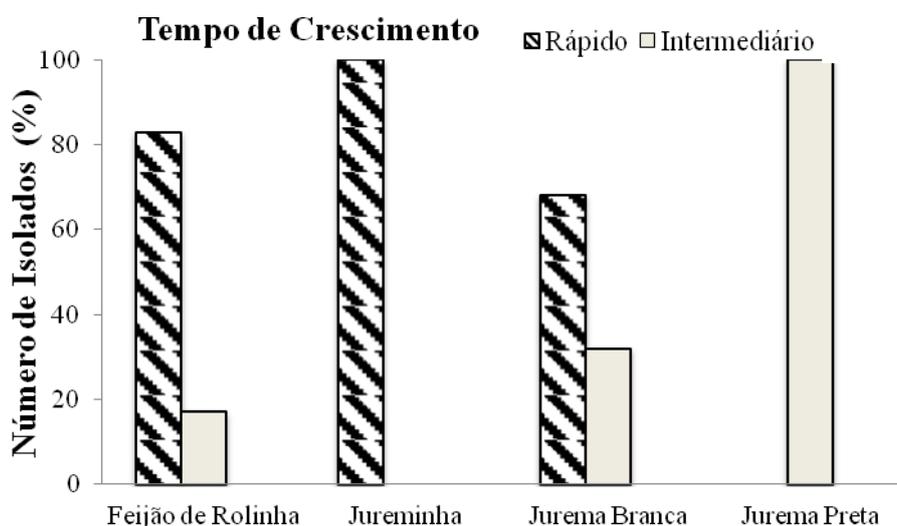


Figura 8. Tempo de crescimento em meio LMA, obtidos dos nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana.

Estudo realizado por Stamford et al. (1996), com leguminosas em solo da região Semiárida pernambucana constatou que 90% dos isolados obtidos apresentaram crescimento rápido. Nesse mesmo estudo, foi observado que 100% dos isolados obtidos de leguminosas em solos da zona da Mata pernambucana apresentaram crescimento lento. Assim, o tempo de crescimento dos isolados parece estar associada a aspectos ambientais, como altas temperaturas e baixa umidade.

Um das explicações para a maior frequência de rizóbios de crescimento rápido na região Semiárida, proposta por Sprent (1994), é que nessas condições ambientais as estirpes de rizóbio dão prioridade à perpetuação da espécie, em detrimento à fixação de nitrogênio. Assim, à medida que surge condições ambientais adequadas como umidade e temperatura, tanto o rizóbio quanto a leguminosa apresenta a necessidade de se estabelecer rapidamente para perpetuação da espécie. É possível que as condições específicas desta região tenham propiciado a seleção de rizóbios de crescimento rápido.

Outra explicação para esta característica das estirpes é que essas bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, em virtude de uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca, multiplicando-se mais rápido no solo e em curto espaço de tempo úmido (Van Gestel et al., 1991), representando uma forma de

economia no uso de energia para proliferação em relação aos rizóbios de crescimento lento.

A inter-relação das características morfológicas da colônia possibilita observar que estirpes de crescimento rápido produziam muito muco; já as de crescimento lento apresentaram pouco ou nenhuma presença de muco, corroborando com Martins (1996). As estirpes com alta produção de muco são de difícil isolamento, pois essa substância se espalha rapidamente sobre a placa (Campelo, 1976). Esse aspecto também foi observado na presente pesquisa.

Barnet e Catt (1991) estudaram estirpes a partir de isolados obtidos em *Acácia* ssp., em diferentes regiões da Austrália e concluiu que os isolados obtidos eram influenciados por sua localização geográfica, as estirpes de crescimento rápido foram obtidos somente em sítios de zonas áridas de Fowler's Gap.

A maioria das características morfológicas da colônia, como tamanho, produção de muco e elevação estão inter-relacionadas. Assim, na figura 9, está sendo apresentado o tamanho, a produção de muco e a elevação dos isolados bacterianos obtidos nos nódulos de leguminosas forrageiras da região Semiárida paraibana.

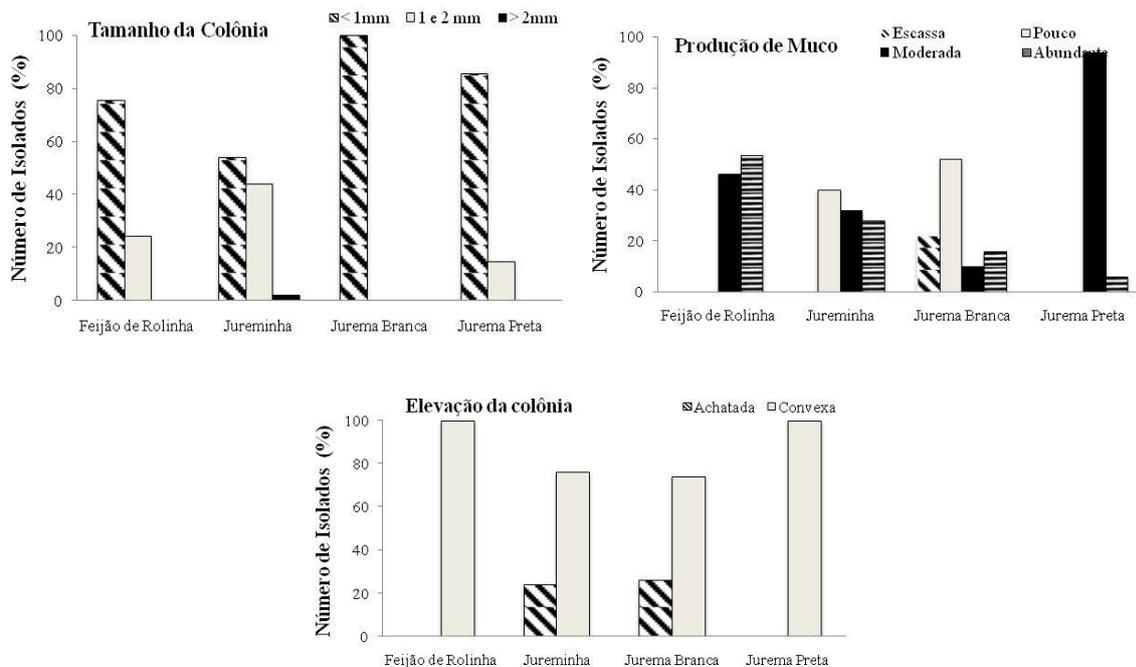


Figura 9. Tamanho, elevação da colônia e a produção de muco dos isolados bacterianos, em meio LMA, obtidos dos nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana.

A colônia de rizóbios pode ser classificada em relação ao tamanho como muito pequenas (<1mm), colônias com diâmetro entre 1 e 2 mm ou maiores que > 2mm (Martins et al., 1997), essa característica está relacionada com a produção de muco, colônias muito pequenas não produzem muco, apresentando superfície seca quanto comparadas a colônias maiores que 1mm.

Segundo Martins et al. (1997), colônias menores que 1 mm de diâmetro não produzem muco. No entanto, nesse trabalho maior parte dos isolados obtidos (78,7%) nas quatro espécies de leguminosas forrageiras, apresentaram tamanho da colônia menor que 1 mm e produção de muco variando de pouco a abundante. Principalmente, os isolados da jurema preta com 82% das colônias menores que 1 mm, mas produzindo muco de forma moderada a abundante.

A característica de alta produção de muco vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo de adaptação e sobrevivência a condições edafoclimáticas (Xavier et al.,1998), uma vez que os mesmos podem formar uma capa protetora à colônia de rizóbio no ambiente natural. Esse muco apresenta como componentes principais os carboidratos EPS (exopolissacarídeos) e CPS (polissacarídeos capsular) que interfere na passagem de substâncias para dentro da célula bacteriana.

O reduzido número de trabalhos que apresentam a descrição de estirpes que produzem excesso de muco causou certa omissão sobre esse grupo de bactérias por bastante tempo. Entretanto, nos estudos de Sinclair e Eaglesham (1984), as estirpes que formaram exopolissacarídeos foram mais eficientes em fixar nitrogênio atmosférico que aquelas que produziam colônias secas sob condições salinas, uma vez que essa alta produção da mucosidade pode representar uma forma de proteção da bactéria aos estresses ocorridos.

Nesse aspecto, pode-se fazer um paralelo com a elevação da colônia e a produção de muco; colônias com superfície mais plana estão relacionadas com pouco muco, enquanto colônias convexas com elevada produção de muco para as espécies de jureminha e jurema Branca (Figura 9).

Silva et al. (2007), ao caracterizarem e selecionarem populações nativas de rizóbios de região Semiárida de Pernambuco observaram em todos isolados formas circulares com elevação convexa.

Na figura 10, observa-se a coloração, forma, superfície e transparência observadas nas colônias isoladas em nódulos de leguminosas forrageiras da região Semiárida paraibana.

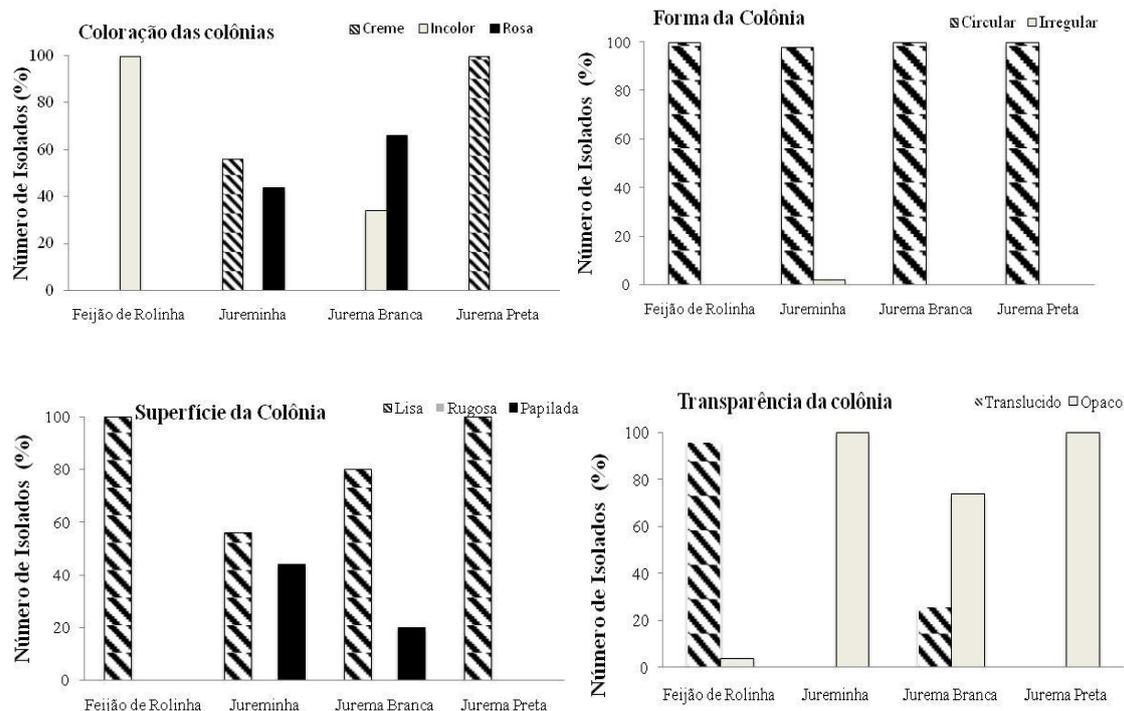


Figura 10. Forma, superfície, coloração e transparência da colônia de rizóbios, em meio LMA, proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região semiárida paraibana.

Em relação à forma da colônia, todos os isolados foram circulares. Segundo Jordan (1984), os rizóbios podem desenvolver colônias de cor branca, incolor, amarela e rósea. Como se observa na Figura 10, os isolados do presente trabalho variaram entre creme, incolor e rosa, diferindo dos resultados obtidos por Silva et al. (2007), que em seu estudo já citado no texto, observou colônias com coloração branco leitosa. Quanto à transparência os isolados caracterizados variaram de opacos a translúcidos.

O crescimento dos isolados de rizóbio provocam modificações no pH do meio (Figura 11), podendo acidificá-lo, alcalinizá-lo ou mantê-lo na neutralidade. Os isolados obtidos na Jureminha e Jurema preta mantiveram a neutralidade do meio de cultura, não seguindo a tendência dominante de acidificá-lo, mesmo com isolados de crescimento rápido. Tais resultados são discordantes aos dados obtidos por Medeiros et al. (2009) e Leite et al. (2009), que obtiveram em seus estudos isolados com crescimento rápido e reação ácida do meio de cultura.

Segundo Tan e Broughton (1981), mudanças no pH por rizóbios em meio LMA, são causadas pela utilização preferencial de açúcares (Galactose) por estirpes de

crescimento rápido, comparados a estirpes de crescimento lento que utiliza compostos nitrogenados.

As estirpes de jurema branca e feijão de rolinha apresentaram capacidade de acidificar e também de neutralizar o meio de cultura. Nenhum dos isolados alcalinizou o meio.

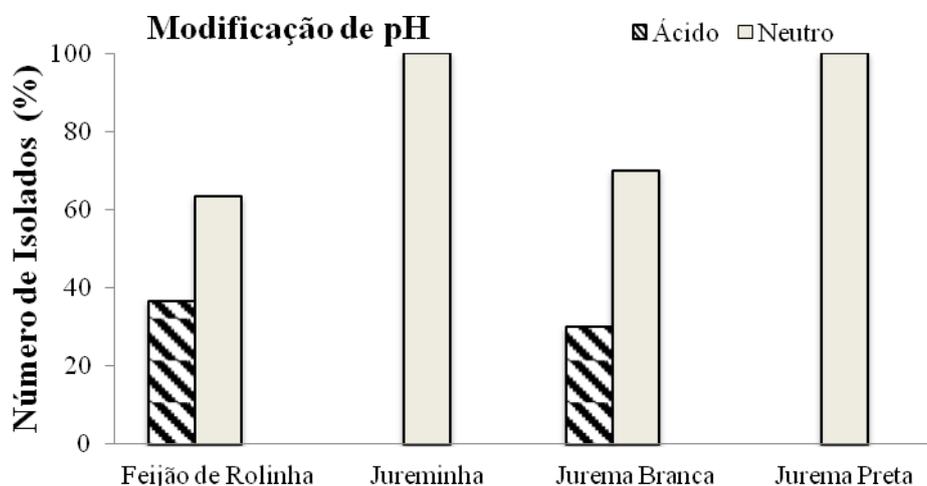


Figura 11. Modificação de pH em meio LMA de rizóbios proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

As características morfológicas, como tempo de crescimento, produção de muco e reação de pH estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 2. Identificação dos gêneros de isolados obtidos a partir das características fenotípicas.

Espécies	Características
Feijão-de-rolinha	Crescimento rápido a intermediário, produção de muco que vai de moderado a abundante e reação de pH ácida a neutra entre os isolados.
Jureminha	Crescimento rápido, a produção de goma variou de pouco a abundante e reação neutra.
Jurema Branca	Crescimento rápido a intermediário, produção de muco que variou de escassa a abundante e apresentou reação ácida e neutra.
Jurema Preta	Crescimento intermediário, produção de muco que ficou entre moderado a abundante e reação de pH neutra.

Agrupamento por similaridade

Os resultados das análises morfológicas foram agrupados de acordo com o coeficiente de Jaccard (J). Foram gerados 4 dendrogramas, uma para cada espécie de leguminosa em estudo. Para tanto, inicialmente foi eliminada das análises as características que apresentaram 100% de similaridade, isso permitiu a diminuição de múltiplas bifurcações na árvore.

Jurema Preta

Analisando a árvore gerada pelos dados fenotípicos das colônias (Figura 12), observou-se que a distância entre isolados variou de 30% a 100% de similaridade, obtendo-se 2 grupos com índice de similaridade em torno de 30% , apresentando 4 fenótipos distintos. O grupo I foi formado por 93% dos isolados enquanto o grupo II apresentou apenas 7% dos isolados. O grau de similiaridade em torno de 30% evidencia menor diversidade, comparada as demais espécies.

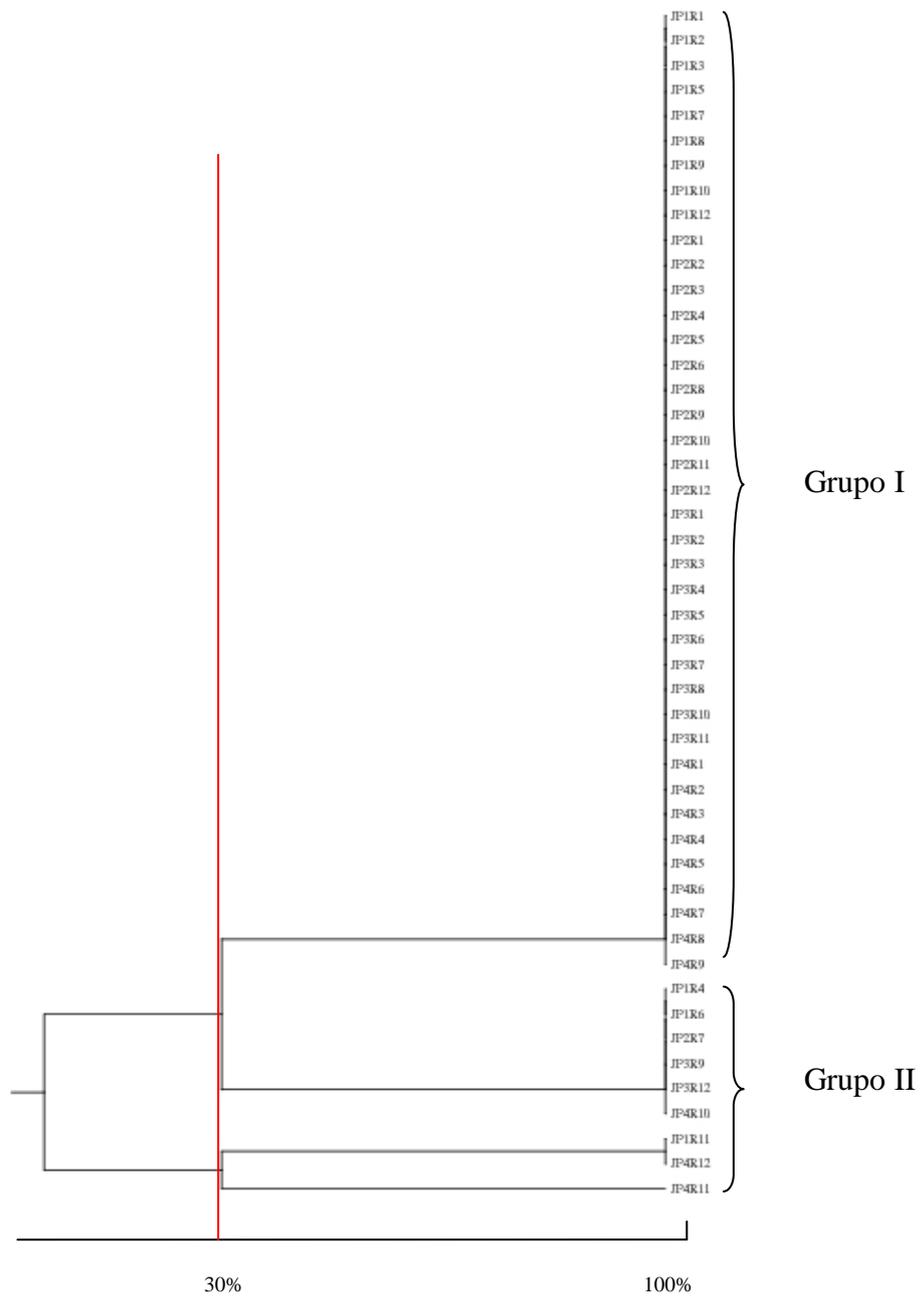


Figura 12. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jurema preta, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Feijão-de-rolinha

Analisando o dendrograma gerado a partir dados fenotípicos das colônias (Figura 13), observou-se que a distância entre isolados variou de 22% a 100% de similaridade, obtendo-se 8 grupos com 70% de similaridade com 11 fenotipos distintos, onde o grupo III foi formado por 46% dos isolados, seguido pelo grupo II, I e V com 27%, 12 % e 4% dos isolados respectivamente. Os demais grupos foram formados por menos de 2% dos isolados. Baseando nos resultados apresentados, grau de similiaridade em torno de 70% evidencia uma elevada diversidade, segundo o coeficiente de jaccard.

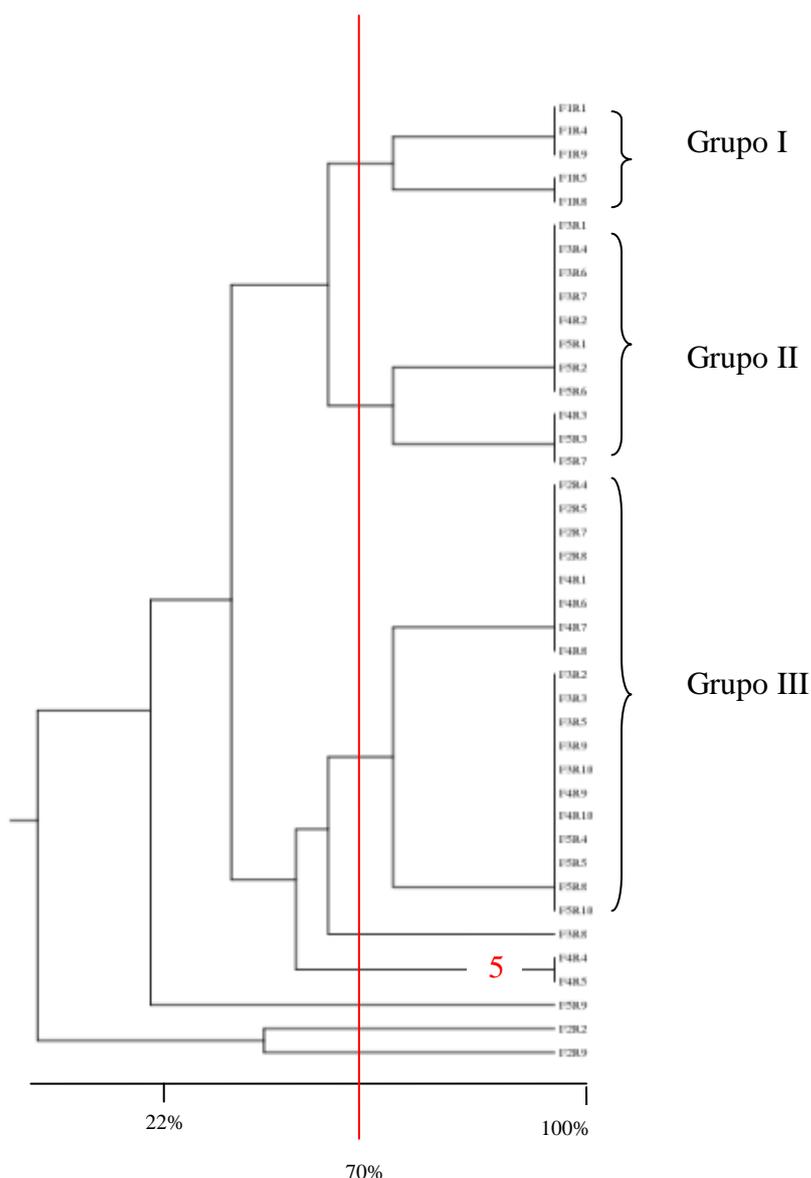


Figura 13. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos do feijão-de-rolinha, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Jurema Branca

O dendrograma gerado a partir dados fenotípicos das colônias obtidas a partir dos nódulos de jurema Branca (Figura 14), constatou-se a distância entre isolados variou de 40% a 100% de similaridade, obtendo-se 9 grupos com 70% de similaridade com 15 fenotipos, onde a maior porporção de isolados foi constatada no grupo IV com 32% dos isolados, seguido Grupo I com 24%, os grupos VIII e IX com 10%, grupo III com 8 % os isolados. Os demais grupos foram formados por menos de 3% dos isolados. Os isolados apresentaram grau de similiaridade abaixo de 80% evidencia elevada diversidade, visto que há grupos muitos distante entre si.

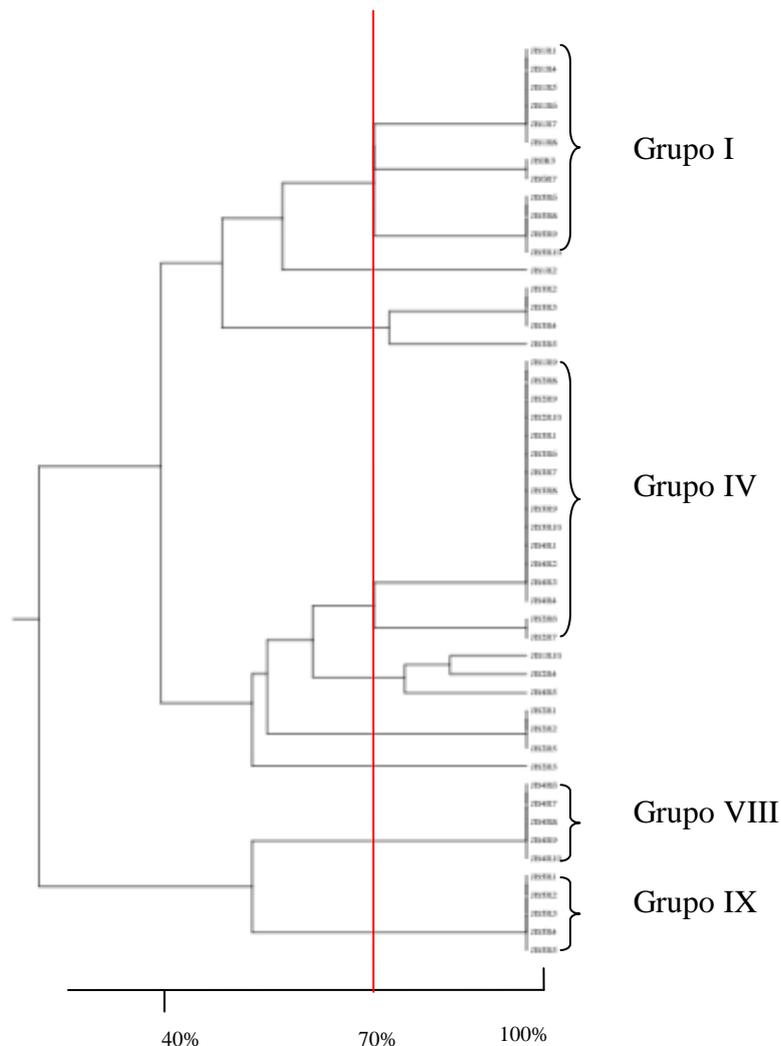


Figura 14. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jurema branca, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Jureminha

O dendrograma gerado a partir dos fenotípicos das colônias obtidas dos nódulos de jureminha (Figura 15), observou-se a distância entre isolados variou de 18% a 100% de similaridade, obtendo-se 15 grupos com 70% de similaridade com 31 fenotipos, onde a maior porporção de isolados foi constatada no grupo V com 22% dos isolados, seguido pelo grupo I, VII e IX com 14%, 12% e 8% dos isolados respectivamente. Os demais grupos foram formados por menos de 4% dos isolados. Apartir dos resultados mostrados na figura os isolados apresentaram similaridade abaixo de 80% demonstrando elevada diversidade, visto que há grupos muitos distante entre si.

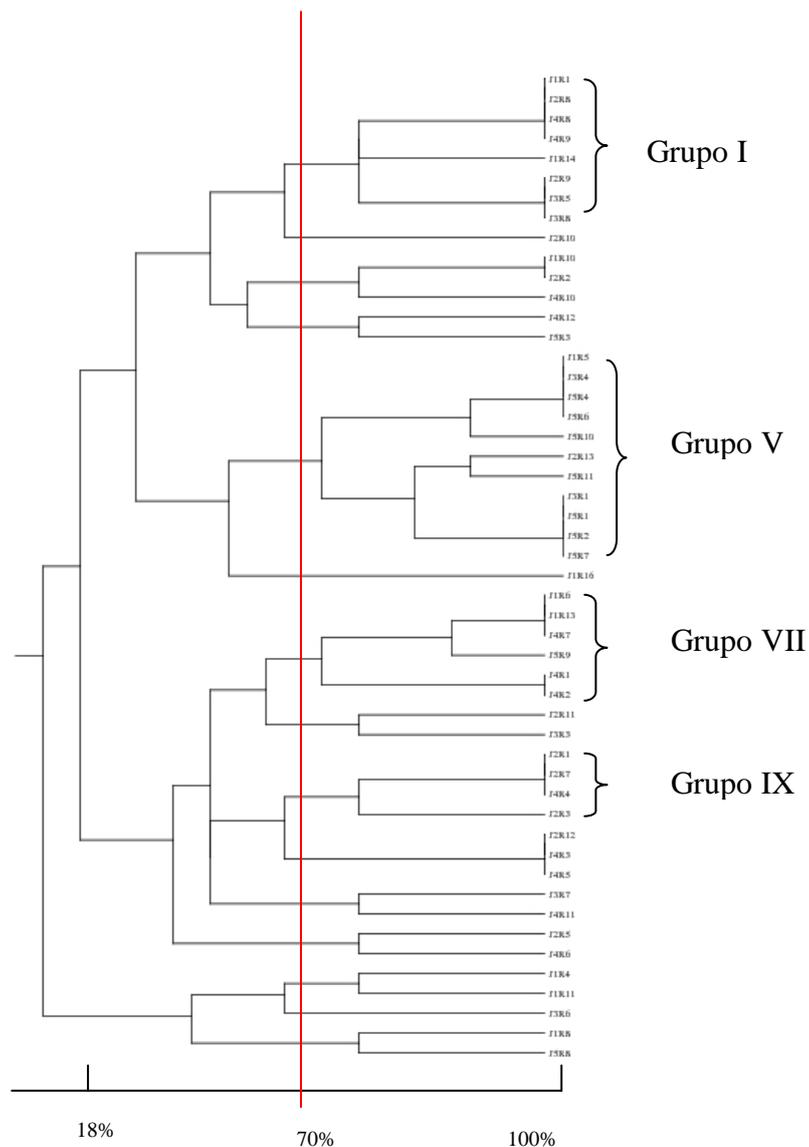


Figura 15. Dendrograma de similaridade em função das características morfológicas dos 50 isolados obtidos da jureminha, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

4- CONCLUSÕES

- Dentre as espécies avaliadas, a catingueira e o mororó não apresentam nodulações, caracterizando serem antagônicas a nodulação com rizóbios;
- O feijão de rolinha, jureminha e jurema branca apresentam estirpes de crescimento rápido, enquanto a jurema preta intermediário;
- A jurema preta, dentre as espécies avaliadas, é a que produz mais muco nos isolados;
- As características morfológicas das bactérias isoladas de nódulos de leguminosas com potencial forrageiro indicam que há elevada diversidade fenotípica entre grupos de rizóbios por espécie;

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, O. N.; Allen, E. K. The leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation. Wisconsin, University of Wisconsin Press, p. 812, 1981.
- Aragão, W. M.; Martins, P. S. Jureminha (*Desmanthus virgatus* L.): uma leguminosa forrageira promissora. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.40,1996.(Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 5).
- Barberi, A.; Carneiro, M. A. C.; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*, v.4, n.1, p.145-153, 1998.
- Barnet, Y. M.; Catt, P. C. (1991). Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Accacia* spp. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.135, p.109-120.
- Campelo, A. B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais. Itaguaí: UFRRJ, p.122, 1976. Tese de Mestrado.
- Costa Júnior, C. R.; et.al. Isolamento e caracterização de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras. IX Jornada Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX). Recife, 2009.
- Costa, C. G. F. Caracterização fenotípica de rizóbios de solo rizosférico de leguminosas nativas do semi-árido cearense / Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Depto. de Biologia, 2010.
- Dendroupgma;Garcia-Vallvé, Santi; Puigbo, Pere. <http://genomes.urv.es/UPGMA/>. Acesso em 07 de 2011, disponível em D-UPGMA- DendroUPGMA: A dendrogramconstructionutility; UniversitatRovira i Virgili (URV). Tarragona. Spain.. (2009)
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, Dez. p. 7, 1997. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 43).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Araujo, R. S.; Hungria, M. Eds. Brasília. Embrapa-SPI. p. 542, 1994.
- Faria, S. M.; Franco, A. A.; Jesus, R. M.; Menandro, M. S.; Baitello, J. B.; Mucci, E. S. F.; Dobereiner, J.; Sprent, J. I. New nodulating legume trees from southeast Brazil. *New Phytologist*, v. 98, p. 317-328, 1984.

- Faria, S. M.; Lewis, G. P.; Sprent, J. I.; Sutherland, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist*, v.111, p.607-619, 1989.
- Fernandes, M. F.; Fernandes, R. P. M.; Hungria, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.
- Franco, A. A.; Döbereiner, J. Especificidade de hospedeiro na simbiose com Rhizobio - Feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.2, p.467-474, 1967.
- Freitas, A. D. S.; Silva, T. O.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Araújo, E. R.; Fraga, V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.
- Freitas, A. D. S.; Vieira, C. L.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Lyra, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.
- Hungria, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M. ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa, Cap. 2, p. 45-59, 1994.
- Jaccard, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* v.44, p.223-270, 1908.
- Jordan, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.32, p.136-139, 1984.
- Leite, J.; Seido, S. L.; Passos, S. R.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G.; Martins, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, 2009.
- Martins, L. M. U.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*. v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.
- Martins, L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 5, n. 6, p. 1005-1010, 1996.
- Medeiros, E. V.; Martins, C. M.; Lima, J. M. A.; Fernandes, Y. T. D.; Oliveira, V. R.; Borges, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em

- solos do Estado do Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Maringá, v. 31, n.3, p. 529-535, 2009.
- Melloni R.; Moreira F. M. S.; Nóbrega R. S. A.; Siqueira, O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, n. 30, p. 235-246, 2006.
- Moreira, F. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: Araújo, M. R. S.; Hungria, M. *Microorganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA, p.121-150, 1994..
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.729, 2006.
- Moreira, F. M. S.; Gillis, M.; Pot, B.; Kersters, K.; Franco, A. A. Characterization of rhizobia isolate from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.
- Neder, R. N. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo-SP. ed. Nobel, p.35-38, 1992.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Drozdowicz, A. Influência da Antibiose Exercida por Actinomicetos às Estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na Nodulação da Soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.34, n.1, p.99-108, 1999.
- Polhill, R. M. Papilionoideae. *In Advances in legume systematics*. (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). Royal Botanical Gardens, Kew, Part 1, p.191-204, 1981.
- Rohlf, F. J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.0. New York: Exeter Publications, 1997.
- Seganfredo, M. A. Leguminosas de verão: capacidade para fixação simbiótica de nitrogênio e potencial de utilização no sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.25, n.3, p.481-487, 1995.
- Sinclair, N.; Eaglesham, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 16, p.247-251, 1984.
- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F.; Martínez, C. R.; Seldin, L.; Burity, H. A.; Figueiredo, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. *Acta Science Agronomy*, v. 29, p. 331-338, 2007.

- Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 12-16, 2007.
- Sprent, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory. Plant and Soil, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- Stamford, N. P.; Santos, C. E. R. S.; Medeiros, R.; Figueiredo, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.20, 49-54, 1996
- Tan, I. K. P.; Broughton, W. J. Rhizobia in tropical legumes - Bio chemical basis of acidandalka lireations . Soil Biology and Bio chemistry , Oxford , v.1 3, 389-393, 1981.
- Van Gestel, M.; Ladd J. N.; Amato, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. Soil Biology and Biochemistry, v.23, p.313-322, 1991.
- Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell, p.164, 1970.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.27, p.386-392, 1998.
- Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R.; Coutinho, H. L. C.; Neves, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciência e Tecnologia. v.20, p. 391-411, 2003.

Capítulo III

Tolerância de rizóbios de leguminosas com potencial forrageiro a salinidade, temperatura e pH do meio de cultura.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PAULO,P.F.M. Tolerância de rizóbios de leguminosas forrageiras do semiárido paraibano a níveis de salinidade, temperatura e pH do meio de cultura. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. UFPB. Areia-PB. Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade.

RESUMO:

No Brasil a salinidade é um dos processos mais importantes entre os que atuam na redução da produtividade em regiões semiáridas juntamente com as temperaturas elevadas e pH, a seleção de estirpes tolerantes a estas condições seria uma alternativa viável para sistemas agropecuários no Semiárido. O objetivo deste trabalho foi testar a tolerância a diferentes níveis de salinidade, temperatura e pH os isolados de rizóbios obtidos de quatro leguminosas com potencial forrageiro do Semiárido da Paraíba. Os rizóbios foram submetidos a testes com relação à tolerância a NaCl, temperatura e pH empregando método de avaliação *in vitro* e estimar a diversidade de grupos de rizóbios através de características fisiológicas a partir do isolamento dos rizóbios de nódulos das seguintes Fabaceas: *Macroptilium lathyroides*, *Desmanthus pernambucanus*, *Mimosa artemisiana* e *Mimosa tenuiflora*. Diante das características fisiológicas dos isolados foi possível obter estirpes que apresentaram altas tolerâncias a salinidade, temperatura e pH.

Palavras-chave: forragem, rizóbios, solo salino

ABSTRACT

In Brazil, the salinity is one of the most important processes between working in reduced productivity in semi-arid regions with the high temperatures and pH, selecting strains tolerant to these conditions would be a viable alternative to agricultural systems in semi-arid. The objective of this study was to test the tolerance to different levels of salinity, temperature and pH rhizobia isolates obtained from four legumes with forage potential of Paraiba Semi-Arid. The strains were tested with respect to tolerance to NaCl, pH and temperature using in vitro evaluation method and estimate the diversity of rhizobia groups through physiological characteristics from the isolation of rhizobia nodules of the following Fabaceae: *Macroptilium lathyroides*, *Desmanthus pernambucanus*, *artemisiana* *Mimosa tenuiflora* and *Mimosa*. On the physiological characteristics of the isolates was possible to obtain strains that showed high tolerance to salinity, temperature and pH.

Keywords: forage, rhizobia, saline soil

1- INTRODUÇÃO

No Brasil a salinização constitui uma das mais sérias formas de degradação dos solos, apresentando maior ocorrência na região Semiárida do Nordeste, em virtude de suas características edafoclimáticas (Mota e Oliveira, 1999).

No Semiárido nordestino vários são os fatores limitantes no processo produtivo de alimentos e forragens, dentre eles, a salinização pode ser destacada. Aproximadamente 4 milhões de hectares dessa região são afetados pela salinidade (Oliveira, 1997) e há potencialmente cerca de 9 milhões de hectares com riscos de salinização (Pereira *et al.*, 1985). Estes solos são altamente afetados pelo excesso de sais solúveis ocasionando redução do seu potencial hídrico, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas associados a efeitos tóxicos dos sais afetando diretamente seu desenvolvimento (Rebouças *et al.*, 1989). Além disso, processos biológicos que ocorrem no solo, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), podem ser afetados diretamente (Shereen *et al.*, 1998).

Assim como as plantas, as bactérias diazotróficas simbióticas apresentam grande variação na tolerância à salinidade. Os rizóbios nativos adaptados às condições adversas da região, como a tolerância à salinidade (Stamford *et al.*, 1988), pH (Martins *et al.*, 1997), temperatura (Pereira *et al.*, 1999) e a escassez hídrica, representar um recurso importante, pela possibilidade de utilização desses micro-organismos na FBN, incrementando a produção de leguminosas com potencial forrageiro.

A seleção de estirpes de rizóbio nativos adaptáveis a região Semiárida amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento da bactéria na associação com as leguminosas, podendo aumentar sua produtividade. Para tanto, testes *in vitro* podem ser utilizados antes da verificação no campo, pois, além de permitirem a comparação de um grande número de microrganismos, são rápidos e de custo relativamente baixo, possibilitando a identificação de estirpes tolerantes à condição desejada (Nóbrega *et al.* 2004). Esta seleção é feita com o objetivo de se obter um inoculante competitivo capaz de se estabelecer mais rapidamente no solo e tolerar melhor estresses ambientais como temperatura, salinidade e acidez (Silva *et al.*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo testar a coleção de rizóbios obtida em estudos preliminares, caracterizar fisiologicamente, testando sua tolerância a diferentes níveis de salinidade, temperatura e pH os isolado de rizóbios obtidos das leguminosas o feijão de rolinha (*Macroptilium lathyroides*), jureminha (*Desmanthus pernambucanus*), jurema

branca (*Mimosa artemisiana*) e jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) que apresentam com potencial forrageiro do Semiárido da Paraíba.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os 50 isolados bacterianos de cada espécie de leguminosa em estudo, quanto à diversidade de bactérias em solos do Semiárido paraibano, descrita no capítulo 1, foram testados em níveis crescentes de cloreto de sódio, pH e temperatura em meio de cultura, com a finalidade de testar a tolerância desses isolados.

2.1 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

A habilidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl foi determinada pela incubação dos isolados em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo LM (Vincent, 1970) acrescidos com 0,1% (0,27g L⁻¹), 0,5% (1,35g L⁻¹), 1% (2,7g L⁻¹), 5% (13,5g L⁻¹) e 10% (27g L⁻¹) de NaCl solúvel em meio de cultura (Tabela 1), incubados a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm durante três dias.

Tabela 1. Condutividade Elétrica do meio de cultura de acordo com os níveis de NaCl aplicados

Nível de NaCl	Condutividade Elétrica
g L ⁻¹	($\mu\text{S cm}^{-1}$)
0,27	2,77
1,35	8,32
2,70	16,76
13,50	64,7
27,00	103,8

Tubos com turbidez no caldo foram considerados com crescimento positivo e não turvos negativos (Figura 9). Duas testemunhas foram utilizadas na comparação, crescidas a pH 6,8 em temperatura de 28°C sob agitação de 120 rpm no mesmo período de tempo. Um tratamento sem inoculação foi utilizado na comparação dos resultados negativos. Os isolados que foram tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).



Figura 1. Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a salinidade.

2.2 Crescimento em diferentes temperaturas

A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi determinada pela inoculação em tubos de ensaio contendo meio LM (Levedura Manitol) (Vincent, 1970), onde os isolados foram incubados a temperatura de 28; 35 e 40°C. Tubos que apresentaram turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo e não turvos, considerados negativos. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento. Os isolados que foram tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).

2.3 Crescimento em diferentes pH

Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes pH, tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo LM (Vincent, 1970), com pH previamente ajustados para 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10, utilizando NaOH ou HCl, foram inoculados e crescidos a uma temperatura de 28°C sob agitação orbital de 120 rpm. A análise de crescimento foi determinada três dias após a incubação. Tubos que apresentaram turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo e não turvos considerados negativos (Figura 8). Foram inoculadas duas testemunhas que cresceram em caldo LM (Vincent, 1970) com pH 6,8 e temperatura de 28°C sob agitação orbital de 120 rpm. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento. Os isolados que foram tolerantes receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).

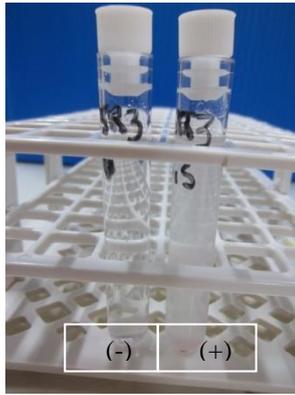


Figura 2. Isolados crescidos em tubos contendo meio LMA líquido para teste de tolerância a temperatura, pH e salinidade.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da tolerância de isolados de rizóbios em diferentes concentrações de NaCl

Os isolados obtidos em todas as espécies analisadas apresentaram tolerância aos níveis de 0,1 a 5% de salinidade (Figura 3). À medida que o níveis de salinidade aumentaram para 10% foi constatado crescimento apenas de estirpes provenientes dos nódulos de jurema preta. Essa constatação pode estar associada à elevada produção de muco dessas colônias observada em estudos preliminares, corroborando com Martins et al. (1997), que correlacionaram maior produção de muco com tolerância às condições salinas em rizóbios isolados de caupi cultivados em solos do Nordeste. Coutinho et al. (1999), sugeriram que a produção de muco pode representar um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios, em condições adversas.

Estudos realizados em regiões semiáridas obtiveram crescimento positivo ao nível de 3% de salinidade (Medeiros et al., 2007; Xavier et al.,2007). Resultados semelhante foram encontrado por Nunes et al.(2009) em solos de regiões Semiáridas que aproximadamente 50% dos 76 isolados analisados apresentaram tolerância a 3% de NaCl.

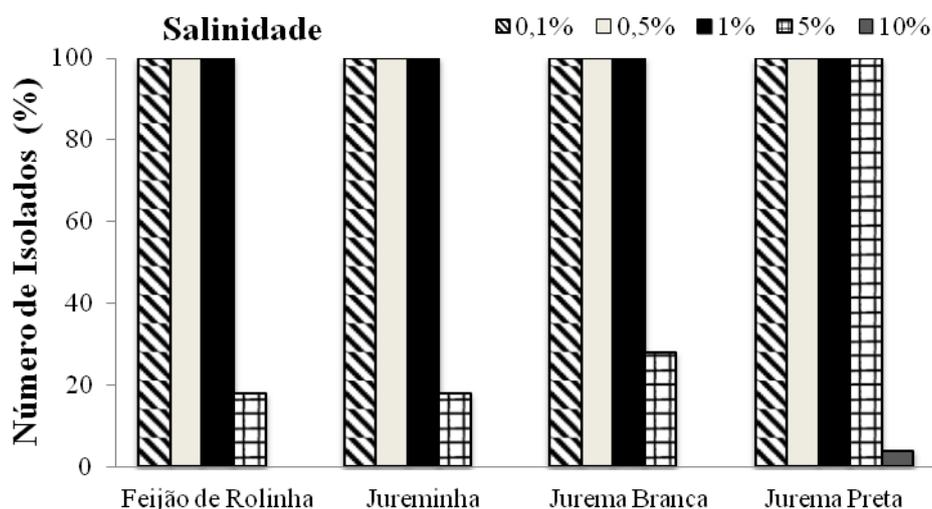


Figura 3. Tolerância a diferentes concentrações de NaCl, em meio LMA líquido, de isolados proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Outros estudos avaliando a resistência a salinidade em regiões áridas e semiáridas do norte da África observaram tolerância em concentrações altas de salinidade em meio de cultura (Brhada et al., 2001; Essendoubi et al., 2007)

Os rizóbios podem sobreviver na presença de níveis extremamente elevados de salinidade e apresentar marcante variação de tolerância a essa salinidade (Bouhmouch et al., 2004). Diversos mecanismos podem estar envolvidos na tolerância a estresse osmótico em bactérias do solo, dentre as quais a produção de trealose (Streeter, 2003), betaína e glutamina (Räsänen et al., 2004). Estes mecanismos estão presentes em bactérias resistentes tanto em isoladas de solos salinos e não salinos (Fernandes Junior, 2009). Outro aspecto importante da tolerância bacteriana à salinidade é a habilidade destes de sobreviver às elevadas concentrações de sódio inibindo o próprio crescimento. Cepas que podem sobreviver a altas taxas de salinidade em solos podem prontamente iniciar sua multiplicação se a salinidade baixar (Bouhmouch et al., 2004).

Avaliação da tolerância de isolados de rizóbios a diferentes temperaturas.

Um bom percentual dos isolados foi capaz de sobreviver quando incubados a temperatura mais elevada, os isolados provenientes do feijão de rolinha apresentaram melhor desempenho com crescimento de 63,4% dos isolados a temperatura de 40°C, seguido dos isolados da Jurema branca 30%, Jurema Preta 25% e por fim Jureminha com 20% (Figura 4). Essa constatação pode estar associada à elevada produção de goma nos isolados de feijão de rolinha, corroborando o Hollingworth et al. (1985), que constataram maior produção de muco quando as bactérias isoladas de caupi foram submetidas a temperaturas superiores a 40°C. De acordo com Xavier et al. (1998), os rizóbios produtores de muco apresentaram maior tolerância a altos níveis de estresse, como temperatura elevada, sugerindo maior capacidade de sobrevivência e maior competitividade na rizosfera.

A influência da temperatura no crescimento e desempenho do rizóbio é um fator importante, pois regiões áridas e semiáridas podem atingir temperaturas superiores a 40°C nas camadas superficiais, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao processo da fixação simbiótica do nitrogênio (Vargas e Hungria, 1997). A capacidade de estirpes nodular a altas temperaturas, em zonas áridas e semiáridas permanece desconhecida. Isto talvez se deva a certas mudanças metabólicas ocorrendo nas células bacterianas sob condição de altas temperaturas (Nandal et al., 2005)

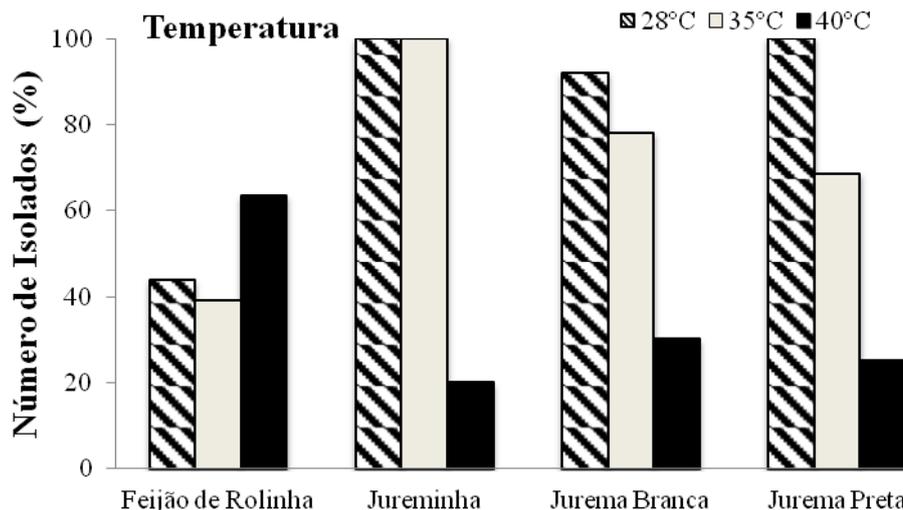


Figura 4. Tolerância a diferentes temperaturas, em meio LMA líquido, de bactérias provenientes de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Um dos primeiros relatos de isolados tolerantes a temperatura foi descrito por Hartel e Alexander, (1984) no Oeste da África onde os isolados localizados em Maradi foram significativamente tolerantes a temperaturas, até então a habilidade de crescer a 40°C era uma característica considerada pouco freqüente entre os rizóbios.

Estudos realizados recentemente no Nordeste brasileiro demonstram que isolados das regiões mais quentes e secas apresentam capacidade de crescer em temperatura elevadas. Medeiros et al. (2007) e Nunes et al. (2009), isolando bactérias a partir dos nódulos da região semiárida do nordeste brasileiro observaram a capacidade de crescimento em temperaturas superiores a 40°C.

Avaliação da tolerância de isolados de rizóbios a diferentes pH.

Dos 50 isolados utilizados para cada espécie (Figura 15), quase todos cresceram em pH 7, o que já era esperado, visto que a faixa ideal para o crescimento do rizóbio varia entre 6,8 e 7. Quando submetidos ao pH 8, apenas 44% dos isolados de feijão de rolinha apresentaram crescimento. Nas demais espécies, mais 80% dos isolados foram tolerantes aos 5 níveis de pH.

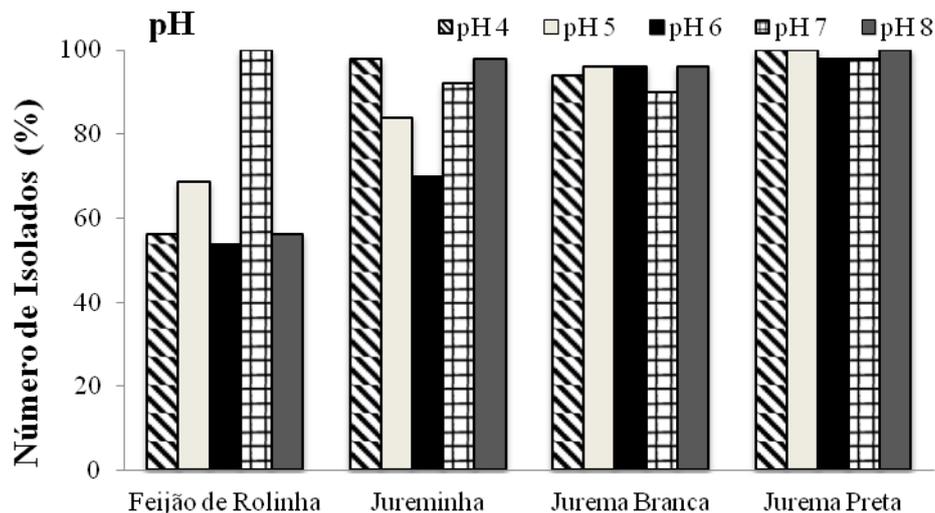


Figura 5. Tolerância a diferentes níveis de pH, em meio LMA líquido, de isolados proveniente de nódulos de feijão de rolinha, jureminha, Jurema Branca e Jurema Preta da região Semiárida.

Hungria e Vargas (2000), trabalhando com rizóbio em condições de baixo pH, constataram diminuição no seu crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis à esse fator. Aarons e Graham (1991) observaram que em meio ácido há uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode afetar seu crescimento.

Diferindo dos trabalhos citados, Bezerra (2009), isolando bactérias a partir de solo da região Semiárida mostrou que estes apresentaram maior predisposição em suportar condições extremas de pH e salinidade. Corroborando com resultados deste estudo onde os isolados demonstraram alta tolerância a pH, salinidade e temperatura.

Assim, esses resultados sugerem que as estirpes com melhores resultados aos teste fisiológicos e já adaptadas a região sejam inoculadas, essa tolerância pode beneficiar a produção pecuária. Como forragem o feijão de rolinha, jureminha, jurema branca e jurema preta podem representar uma alternativa muito interessante para a produção de bovinos e caprinos em regiões Semiáridas.

Uma das grandes limitações para produção pecuária no bioma da caatinga é a falta de forragem no período seco, além da dificuldade de estabelecer uma pastagem sem sistema de irrigação (Fernandes Junior, 2009). Desta forma a disponibilidade de material com alta resistência à salinidade e tolerância à seca pode representar uma estratégia para pecuária no semiárido.

4- CONCLUSÕES

- As bactérias isoladas das leguminosas do semiárido paraibano, com potencial forrageiro, apresentam tolerância às condições de estresse do meio a que foram submetidas nos testes realizados;
- Os isolados com produção de muco moderada à abundante mostram maior tolerância a salinidade, pH e temperatura;
- Os isolados provenientes dos nódulos obtidos da jurema preta apresentam maior crescimento em meio salino quanto comparado aos de feijão de rolinha, jureminha e jurema branca.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrons, S. R.; Graham, P. H. Response of *Rizobium leguminosarum* bu *phaseoli* to acidity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.145-151, 1991.
- Brhada, F.; Poggi M. C.; Sypce, G. V.; Le Rudulier, D.; Osmoprotection mechanisms in rhizobial isolated from *vicia faba* var. Major and *cicer arietinum*. *Agronomie*, v.21, p. 583-590, 2001.
- Bezerra, R. V.; Biodiversidade e efetividade de rizóbios nativos de solos do semi-árido de Pernambuco em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) / Rosemberg de Vasconcelos Bezerra. 2009.
- Bouhmouch, I.; Souad-Mouhsine, B.; Brhada, F.; Aurag, J. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1103-1113, 2004.
- Coutinho, H. L. C.; Oliveira, V. M.; Lovato, A.; Maia, A. H. N.; Manfio, G. P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p.159-167, 1999.
- Essendoubi, M., Brhada, F., Eljamali, J. E., Filali- Maltouf, A., Bonnassie, S., Georgeault, S., Blanco, C., and Jebbar, M. Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environ. Microbiol.* v.9, n.3, p.603-611, 2007.
- Fernandes Júnior, P. I. Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros bactérias isoladas de nódulos de guandu. TESE, UFRJ 2009.
- Hartel, P. G.; Alexander M. Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobium. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 30, p. 820-823, 1984.
- Hollingsworth, R.; Smith, E.; Ahmad, M. H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.142, p.18-20, 1985.
- Hungria, M.; Vargas, M. A. T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- Martins, L. M. U.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the noeth-east of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**. v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.

- Medeiros, E. V.; Silva, K. J. P.; Martins, C. M.; Borges, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n. 2, p.9, 2007.
- Mota, F. O. B.; Oliveira, J. B. Mineralogia de solos com excesso de sódio no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 23, n. 4, p.799-806, 1999.
- Nandal, K.; Sehrawat, A. R.; Yadav, A. S.; Vashishat, R. K.; Boora, K. S. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*). **Microbiological Research**, p. 367-373, 2005.
- Nunes, G. F. O.; Leite, J.; Cunha, J. B. C.; Seido, S. L.; Sampaio, A. A.; Nascimento, J. N.; Carvalho, D. T. Q.; Yanomelo, A. M.; Martins, L. M. V.; Tolerância de rizóbios isolados de duas cultivares de guandu à salinidade e a elevada temperatura *in vitro*. 32º Congresso Brasileiro Ciências Solo, 2009, Fortaleza, CE. Anais..., 2009.
- Nóbrega, R. S. A.; Motta, J. S.; Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. *Ciência agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- Oliveira, O. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Simpósio Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada. Campina Grande. UFPB, 1997.
- Pereira, J. R.; Valdivieso, C. R.; Cordeiro, G. C. Recuperação de solos afetados por sódio através do uso do gesso. In: Seminário Sobre o Uso de Fosfogesso na Agricultura, Brasília, p.85-105, 1985.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Drozdowicz, A. Influência da Antibiose Exercida por Actinomicetos às Estirpes de Bradyrhizobium spp., na Nodulação da Soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.34, n.1, p.99-108, 1999.
- Räsänen, L. A.; Saijets, S.; Jokinen, K.; Lindstöm, K.; Evaluation of the role of two compatible solute, glycine betaine and trchalose, for the Acacia Senegal-sinorhizobium symbiosis exposed to drought stress. **Plant and Soil**, Dondrecht, v.260, p.237-251, 2004.
- Rebouças, M. A. A.; Façanha, J. G. V.; Ferreira, L. G. R.; Prisco, J. T. Crescimento e conteúdos de N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 1, n. 1, p. 79-85, 1989.

- Shereen, A.; Ansari, R.; Naqvi, S. S. M.; Soomro, A. Q. Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). *Pakistan Journal of Botany*, Pakistan, v. 30, n. 1, p. 75- 81, 1998.
- Silva, A. F.; Freitas, A. D. S; Stamford, N. P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 5, p. 1327-1333, 2002.
- Stamford, N. P.; Vasconcelos, I.; Almeida, R. T. Fixação Biológica de nitrogênio em caupi na região Nordeste brasileira En: Araújo, J.P. O Caupi do Brasil. Brasília: IITA/Embrapa, p.477-504, 1988.
- Vargas, M. A. T.; Hungria, M. *Biologia dos solos dos cerrado*. Planaltina: EMBRAPAC/PAC. p.524, 1997.
- Vincent, J. M. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, p.164, 1970.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.386-392, 1998.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M.; Rumjanek, N. G.; Neves, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-árido. **Revista Caatinga** (Mossoró), v.20, n.4, p 01-09, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizadas para estudo da população bacteriana.

Meio de cultura LMA (Vincent, 1970)

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Agar	15,00g
Água destilada	1000 mL
Ajuste de ph para 6,8	

Meio de cultura LM (Vincent, 1970)

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Água destilada	1000 mL
Ajuste de ph para 6,8	

Azul de Bromotimol (Hungria, 1994)

Solução estoque	0,5g L ⁻¹
Água destilada	1000 mL

Vermelho Congo (Hungria, 1994)

Solução estoque	2,5g L ⁻¹
Água destilada	1000 mL

Meio TY

Tryptona	5 g
Extrato de levedura	0,75 g
KH ₂ PO ₄	0,454 g
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	1,79 g
Água destilada	1000 mL
pH = 6,8	

ANEXO B – Soluções nutritivas utilizadas nas leguminosas

Solução de Jensen Modificada

K_2HPO_4 (0,12 mol L ⁻¹)	10 mL*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,081 mol L ⁻¹) + NaCl (0,34 mol L ⁻¹)	10 mL*
Ca (H ₂ PO ₄) ₂ (0,035 mol L ⁻¹)	10 mL*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,035 mol L ⁻¹)	10 mL*
** Solução de micronutriente	1 mL*
Água destilada	1000 mL*

pH = 6,7; ajustar com NaOH

Solução estoque

*Volume retirado da solução estoque para o preparo de 1 litro de solução de Jensen modificada

**Solução de micronutrientes

H_3BO_3	2,86 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,54 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 g
$NaMoO_4 \cdot 4H_2O$	0,09 g
$CoCl_2$	0,03 g