

Caracterização Polifásica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Guandu

Paulo Ivan Fernandes Júnior¹; Samuel Ribeiro Passos²; Andréa Aparecida de Lima²; Fernanda Santana de Paulo³; Sumaya Mario Nosoline³; Paulo Jansen de Oliveira⁴; Norma Gouvêa Rumjanek⁵; Gustavo Ribeiro Xavier⁵

Resumo

Os estudos de diversidade de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas têm, recentemente, revelado grande diversidade de rizóbios bem como o potencial biotecnológico desses isolados. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de 13 isolados de rizóbio de guandu por meio de uma abordagem polifásica, bem como avaliar o potencial para a nodulação dessas bactérias no hospedeiro original. A diversidade fenotípica das bactérias foi avaliada de acordo com as suas características culturais. A caracterização molecular foi realizada através da restrição do DNA ribossomal (ARDRA) com três enzimas de restrição. A capacidade simbiótica foi avaliada em condições de casa de vegetação. Poucos isolados apresentaram características culturais similares às aquelas apresentadas pelos gêneros de rizóbio clássicos, como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Essa divergência foi confirmada pela análise de restrição do gene 16S rDNA, onde os isolados de rizóbio utilizados como referência apresentaram baixa similaridade com as estirpes de referência. No experimento de casa de vegetação, os isolados apresentaram capacidade de nodular e promover o crescimento vegetal da mesma forma que apresentaram as estirpes recomendadas, com destaque para o isolado de crescimento lento 18.5a2. Esses resultados apontam para uma diversidade ainda não acessada, bem como para o potencial biotecnológico desses isolados.

Palavras-chave: biodiversidade, ARDRA, fixação biológica de nitrogênio, inoculantes.

Introdução

A avaliação da diversidade de rizóbios nodulando adubos verdes tem demonstrado que diversas bactérias isoladas e caracterizadas nos últimos anos pertencem a grupos de rizóbios não descritos, ou ainda a espécies e gêneros de bactérias não consideradas como diazotróficas até recentemente. Estudos de taxonomia bacteriana, como a abordagem polifásica, têm demonstrado estirpes de *Methylobacterium* spp. nodulando crotalária (SY et al., 2001) e *Ochrobactrum* spp. nodulando tremoço (TRUJILLO et al., 2005). Com essa mesma abordagem, bactérias de crescimento capazes de acidificar o meio de cultura têm sido

¹ Pesquisador da Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Zona Rural, Caixa Postal 23, Petrolina, PE, CEP: 56320-970, paulo.ivan@cpatsa.embrapa.br.

² Doutorando (a) em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

³ Mestranda do CPGA-CS/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

⁴ Professor da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Seropédica, RJ.

⁵ Pesquisador (a) Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

agrupadas com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, caracterizadas por apresentarem crescimento lento e que alcalinizam o meio de cultura (LEITE et al., 2009; FERNANDES JÚNIOR et al., 2010). Além de apresentarem elevada diversidade, os rizóbios de adubos verdes podem ter potencial biotecnológico para a produção de inoculantes em leguminosas (MARTINS et al., 2003).

Estudos aliando métodos clássicos e moleculares de taxonomia bacteriana podem auxiliar na compreensão da diversidade de rizóbios associados às leguminosas tropicais, além de revelar o potencial biotecnológico desses isolados (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010, 2011). O guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.), é uma leguminosa de uso múltiplo, podendo ser utilizada para a adubação verde, recuperação de solos depauperados, forragem e alimentação humana. É uma espécie muito rústica e adaptada a regiões com solos ácidos, baixa pluviosidade e elevada temperatura (AZEVEDO et al., 2007). Esta cultura apresenta grande importância social e econômica em algumas regiões do Brasil, como por exemplo, na região semiárida (AZEVEDO et al., 2007). Dessa forma, a obtenção de estirpes eficientes para o guandu pode aumentar a sua produtividade e facilitar o seu estabelecimento no campo. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade simbiótica em condições de casa de vegetação e a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de guandu.

Material e Métodos

As 13 bactérias de guandu utilizadas neste estudo foram isoladas de nódulos de variedades de guandu cultivadas em solos sob pastagem degradada, agricultura orgânica e convencional e apresentam elevada tolerância a altas temperaturas e à salinidade *in vitro* (FERNANDES JÚNIOR, 2009). As colônias foram caracterizadas culturalmente em meio YMA (VINCENT, 1970) avaliando-se o tempo de crescimento, reação de pH, tamanho da colônia, a produção de muco (LEITE et al., 2009).

Para a ARDRA o DNA genômico foi extraído pelo método com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) segundo Xavier et al. (2004). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi dimensionada para 35 µL contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ (1,5 mmol L⁻¹), Taq DNA polimerase 1,75U, dNTP 250 µmol L⁻¹ e 0,2 µmol L⁻¹ de cada um dos iniciadores 27F e 1492R (WEISBURG et al., 1991). A PCR foi realizada com 35 ciclos com a desnaturação de a 93 °C por 1 minuto, anelamento de 58 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Na PCR, foi ainda realizada uma etapa de desnaturação inicial por 5 minutos e outra de extensão final por 10 minutos (LEITE et al., 2009). O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição *DdeI*, *MspI* e *HinfI* de acordo com as especificações do fabricante.

O DNA clivado foi aplicado em gel de agarose 3% (p/v), em tampão TAE 1X, e submetido à voltagem constante de 75°V por 3 horas. Para visualização, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídeo (0,05% v/v) por 10 minutos e fotografado em sistema de fotodocumentação. A imagem do gel foi analisada com o programa Gel Compar 2.0 (*Applied Maths*). O agrupamento foi realizado empregando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

A eficiência simbiótica dos isolados foi avaliada em um experimento em condição de casa de vegetação utilizando-se vasos Leonard modificados com substrato (areia e vermiculita 2:1) estéril. Os tratamentos

utilizados consistiram na inoculação das 13 bactérias isoladas de guandu das estirpes recomendadas para a cultura (BR 2801 e BR 2003), além do controle suplementado com nitrogênio mineral e do controle absoluto. As plantas foram colhidas aos 50 dias após a emergência e avaliou-se os seguintes parâmetros: massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca total (MST=MSPA+MSR+MSN). O experimento foi implantado com o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Sisvar versão 4.5 (FERREIRA, 2008). Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

As características culturais dos isolados demonstraram que a maioria das bactérias apresentara características diferentes daquelas apresentadas pelos rizóbios “clássicos” dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Características culturais típicas do gênero *Bradyrhizobium*, como a capacidade de apresentar crescimento lento e alcalinizar o meio de cultura, foram observadas para os isolados 18.5a2 e 30.6a2 (Tabela 1). O crescimento rápido, capacidade de acidificar o meio e a produção abundante de muco, características de bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizonium* (*Ensifer*), foram observadas em dois dos 13 isolados avaliados (Tabela 1). Nove isolados apresentaram características culturais distintas das observadas para as bactérias pertencentes aos gêneros clássicos de rizóbio. Essa elevada diversidade foi confirmada na avaliação da diversidade genotípica através da técnica de ARDRA (Figura 1). Os isolados avaliados no presente estudo apresentaram baixa similaridade com as estirpes de rizóbio utilizadas como referência. Cinco isolados apresentaram aproximadamente 65% de similaridade com as estirpes de rizóbio pertencentes ao gênero *Rhizobium*, enquanto outros três isolados apresentaram aproximadamente 50% de similaridade com as estirpes referência, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Figura 1). Estes resultados indicam a existência estirpes de rizóbio pertencentes a grupos “novos” dentre as bactérias avaliadas.

Outros estudos avaliando a diversidade e rizóbio associados a adubos verdes no Brasil têm demonstrado alta diversidade fenotípica e genética das estirpes avaliadas para as culturas do guandu (FERNANDES et al., 2003, FERNANDES JÚNIOR et al., 2011); feijão-caupi (LEITE et al., 2009) e mucuna (LIMA, 2008). Grupos culturais com características peculiares, como o crescimento rápido associado à capacidade de alcalinizar o meio de cultura, além da baixa similaridade genética com os isolados de rizóbio pertencentes aos gêneros mais conhecidos têm sido demonstrado para rizóbios isolados de adubos verdes (LIMA, 2008; LEITE et al., 2009), indicando a presença de grupos de micro-organismos ainda não descritas dentre as bactérias formadoras de nódulos avaliadas.

No experimento em condições de casa de vegetação, para a variável MSPA, 12 dos 13 isolados testados, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos inoculados com as estirpes recomendadas e o tratamento que recebeu nitrogênio mineral (Tabela 1). Para a variável MSN, sete dos tratamentos inoculados com os rizóbios avaliados foram estatisticamente iguais aos tratamentos inoculados com as bactérias recomendadas, com destaque para o isolado 18.5a2, que atingiu massa de nódulos secos 10%

superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 2801 e 40% superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 2003 (Tabela 1).

Avaliando-se a variável massa seca de raiz (MSR), todos os tratamentos inoculados foram estatisticamente iguais entre si. A massa seca total dos tratamentos inoculados e do tratamento que recebeu nitrogênio mineral apresentou igualdade estatística e apenas dois isolados apresentaram igualdade estatística à testemunha absoluta (Tabela 1).

Resultados similares foram encontrados ao avaliar a capacidade de nodulação e de estabelecer a simbiose entre isolados de rizóbio obtidos de um sistema de produção agroecológico e as estirpes recomendadas para o feijão de porco em experimentos em condições de casa de vegetação (PAULO et al., 2009). Silva et al. (2007) também verificaram nodulação igual entre os isolados testados e a testemunha inoculada com a estirpe recomendada. Dessa forma, a nodulação e a produção de matéria seca, principalmente, na parte aérea, demonstram o potencial destes isolados para futuros testes em condições não estéreis de casa de vegetação e de campo, indo ao encontro da necessidade de selecionar novas bactérias para a inoculação de adubos verdes como o guandu. Além disso, os estudos de taxonomia polifásica desses isolados podem demonstrar a presença de bactérias novas associadas ao guandu.

Tabela 1. Caracterização cultural das bactérias isoladas de nódulos de guandu utilizadas no presente estudo e eficiência simbiótica dos isolados e de estirpes recomendadas em condições de casa de vegetação.

Isolado (tratamento)	Tempo de crescimento (dias)	Reação de pH	Tamanho da colônia (mm)	Cor da colônia	Produção de muco	MSPA	MSR	MSN	MST
16.2	2	Ácida	4	Branca	Abundante	720a*	460a	60b	1333a
54.3	2	Ácida	4	Branca	Abundante	904a	534a	48b	1842a
54.1	3	Ácida	2	Branca	Abundante	866a	642a	105ab	1520a
8.1c	2	Neutra	2	Amarela	Abundante	482b	280ab	57b	913ab
14.4	5	Neutra	4	Branca	Escassa	596a	312a	66b	1004a
16.6	2	Ácida	4	Amarela	Abundante	798a	416a	108ab	1301a
42.4	3	Alcalina	3	Branca	Escassa	1082a	770a	150a	1982a
18.6	4	Neutra	3	Branca	Escassa	600a	402a	129ab	1221a
24.4b	2	Ácida	2	Branca	Escassa	506ab	244ab	90ab	849ab
46.4	3	Alcalina	3	Branca	Escassa	658a	316a	126ab	1256a
56.4b	2	Ácida	4	Branca	Abundante	612a	494a	60b	1267a

Caracterização Polifásica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Guandu.

18.5a2	6	Alcalina	3	Branca	Escassa	938a	734a	189a	2001a
30.6a2	6	Alcalina	3	Branca	Escassa	1052a	644a	162a	1732a
BR2801						998a	614a	135a	1842a
BR2003						998a	614a	135a	1842a
Testemunha nitrogenada						1012a	770a	-	1666a
Testemunha absoluta						422b	210b	-	735b

MSPA= Massa seca da parte aérea seca; **MSR**= Massa de raiz seca; **MNS**= Massa de nódulos secos; **MST**= Massa seca total.*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

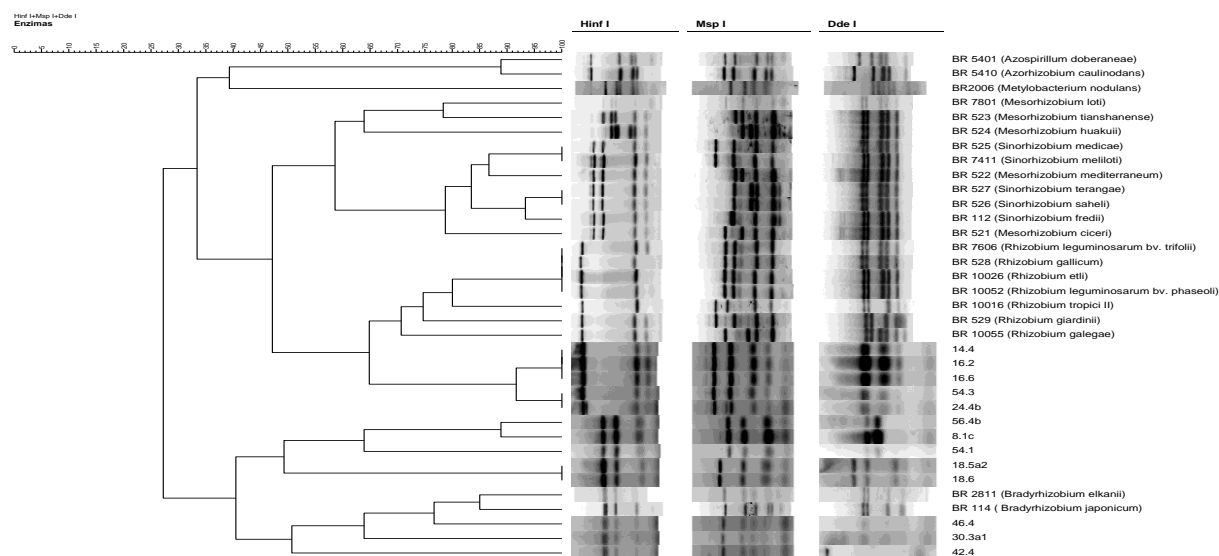


Figura 1. Similaridade genética entre isolados de rizóbio e estirpes referência avaliada através da técnica de ARDRA. Dendrograma construído através do programa Gel Compar 2.0, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Conclusões

Os isolados avaliados no presente estudo apresentam baixa similaridade com os rizóbios utilizados como referência.

Os isolados avaliados apresentam alto potencial para estudos em condições de campo, com destaque para o isolado de crescimento lento 18.5a2.

Referências

- AZEVEDO, R. L.; RIBEIRO, G. T.; AZEVEDO, C. L. L. Guandu: uma planta multiuso. **Revista da Fapese**, Aracaju, v. 3, p. 81-86, 2007.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, p. 911-920, 2003.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de guandu [Cajanus cajan (L.) Millsp.]**. 2009. 187 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Amsterdam, n. 163, p. 473-484, 2011.

Caracterização Polifásica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Guandu.

- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios de isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, n. 45, p. 1.465-1.471, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, n. 6, p. 36-41, 2008.
- 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**, Viçosa, MG, n. 33, p. 1.215-1.226, 2009.
- LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid Region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 38, p. 333-339, 2003.
- PAULO, F. S.; LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; NOSOLINE, S. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Nodulação e produção de massa seca de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) inoculadas com rizóbio nativo de solo de sistema de produção agroecológica. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. **O solo e a produção de bionergia: perspectivas e desafios: trabalhos científicos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. 1 CD-ROM.
- SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, p. 1.232-1.235, 2007.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., n. 183, p. 214-220, 2001.
- TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., n. 71, p. 1.318-1.327, 2005.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.
- WEISBURG, W.G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., n. 173, p. 697-703, 1991.
- XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).