

Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo em Campo Belo do Sul, SC

Glaciela Kaschuk^{1,2}; Julio C.P. Santos³; João F. Berton-Junior⁴; Mariangela Hungria¹. ¹Embrapa Soja; ²Doutoranda sanduíche da Wageningen University, Holanda; ³Prof. UDESC, Lages, SC; ⁴Mestrando em Ciência do Solo, UDESC.

Introdução

Pouco se conhece sobre a dinâmica de populações microbianas da rizosfera, especialmente nos trópicos, embora já existam diversas e modernas técnicas laboratoriais disponíveis para a condução desses estudos. A diversidade de grupos de microrganismos na rizosfera, por exemplo, rizóbios, poderia representar um bom indicador de qualidade do solo, porque estes respondem rápida e sensivelmente às mudanças ambientais do solo e estão presentes em grande densidade de população. Além disso, o maior conhecimento do efeito dos sistemas de manejo do solo sobre as variações populacionais dos rizóbios pode contribuir para o delineamento de estratégias para incrementar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo biológico fundamental à produção vegetal sustentável. Torna-se essencial verificar, particularmente em condições tropicais, o efeito do manejo do solo na diversidade microbiana, bem como se alterações na diversidade resultam em maior sustentabilidade agrícola.

Objetivos

Caracterizar geneticamente rizóbios microssimbiontes de feijoeiro em áreas de plantio direto (PD), plantio convencional (PC) e campo nativo (CN) de Santa Catarina.

Material e Métodos

As amostras de solo foram coletadas em áreas sob PD, PC e CN em uma propriedade rural de Campo Belo do Sul, SC. A área de PD foi cultivada com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), inoculados periodicamente, por 20 anos, sendo os últimos 10 anos sob PD. O teor de nutrientes foi corrigido e o pH foi ajustado para 5,5, segundo análise de solo. A área de PC foi explorada com agricultura por três anos. O pH também foi corrigido para 5,5, entretanto, o solo ainda apresentava algumas limitações de nutrientes, pois as produtividades foram inferiores àquelas obtidas no PD. Ambas as lavouras foram originalmente implantadas sobre o CN e receberam todos os tratamentos fitossanitários necessários. A área de CN vinha sendo utilizada com pecuária extensiva, sem fertilizantes ou implantação de leguminosas, apenas manejada com uso de fogo no inverno. O solo de cada área foi diluído sucessivamente até a diluição de 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL dessa diluição foi, então, inoculada sobre sementes de feijoeiro (cv. Pérola), previamente desinfestadas, para o plantio em areia esterilizada. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por 30 dias e coletadas para retirada dos nódulos. Nódulos foram escolhidos aleatoriamente e os rizóbios foram isolados (Vincent, 1970).

O DNA das bactérias foi extraído a partir de culturas puras de rizóbios em meio YMA, segundo procedimento otimizado (Kaschuk, 2003). O DNA foi amplificado pela técnica de PCR com o "primer" BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) e os seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 6 horas. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,00005%), observado em transluminador UV e fotografado. Essa técnica verificou a variabilidade genética em nível de estirpes. O polimorfismo foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e tolerância de 2%.

O DNA também foi amplificado com "primers" que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA: Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCGTGGCGGC-3') e Y3 (3'-CTGACCCCAACTTCAGCATTGTTCCAT-5'). Os produtos dessas ampliações foram submetidas à metodologia de RFLP-PCR

(Laguerre et al., 1994), com as seguintes enzimas de restrição: *CfoI*; *HinfI*, *MspI*, *RsaI* e *MboI*. Os fragmentos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 3% e corridos em sistema de eletroforese a 120 V durante 4 horas. O polimorfismo foi analisado visualmente e uma letra diferente foi dada a cada perfil distinto, agrupando-se os perfis semelhantes em um mesmo grupo de espécie.

A comparação da diversidade de estirpes foi realizada pela distinção de perfis BOX A1R a 70% de similaridade e pelo cálculo dos índices de diversidade, H' (Shannon & Weaver, 1949), de riqueza genética, $R1$ (Margalef, 1958) e de equidade, E (Pielou, 1977). Também foi construída uma curva acumulativa dos perfis para análise comparativa da variabilidade.

As estirpes utilizadas como referência foram CIAT 899 (*Rhizobium tropici* Tipo IIB), CFN 299 (*R. tropici* Tipo IIA), CFN 42 (*R. etli*), PRF 81 (*R. tropici*), H 152 (*R. giardinii* bv. *gallicum*) e R 602 (*R. gallicum* bv. *gallicum*).

Resultados e Discussão

As técnicas moleculares demonstraram grande diversidade genética de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro nos solos estudados. Pela amplificação do DNA por BOX A1R – PCR foram obtidos 35 perfis das estirpes isoladas do PD, 36 do PC e 20 do CN. Essas amplificações resultaram em um grau elevado de polimorfismo entre as bandas das três áreas de origem. Os dendrogramas demonstraram que as bactérias apresentavam baixa similaridade entre si. As estirpes dos dendrogramas do PD, PC e CN foram agrupadas em níveis de similaridade de apenas 17, 23 e 36% respectivamente (dados não mostrados). Poucas bactérias assemelharam-se às estirpes utilizadas como referência e a maioria apresentou perfil único.

Os perfis com 70% de similaridade na análise de BOX A1R – PCR foram agrupados e uma estirpe representante de cada grupo foi escolhida para a análise de RFLP-PCR da região 16S rDNA. Foram analisadas 24 estirpes de cada sistema de plantio e 12 do CN. Uma grande variedade de perfis foi observada, forte indicativo de diversidade genética elevada, bem como de várias espécies novas, ainda não estudadas.

A diversidade genética elevada observada é um forte indicativo de que muitas espécies de rizóbios dos solos tropicais ainda não foram descritas. Esta situação já havia sido diagnosticada anteriormente (Grange & Hungria, 2004). A escolha da simbiose com feijoeiro provou ser um excelente modelo para estudos de diversidade rizobiana nos solos tropicais. A alta diversidade é, provavelmente, relacionada à natureza promíscua do hospedeiro, que se associa a uma grande diversidade de rizóbios (Michiels et al., 1998).

Os índices de diversidade obtidos com os perfis de BOX A1R – PCR foram semelhantes nos sistemas PD ($H'=2,96$, $R1=6,47$ e $E=0,93$) e PC ($H'=3,02$, $R1=6,42$ e $E=0,95$), contudo, foram inferiores no CN ($H'=2,35$, $R1=3,67$ e $E=0,94$). Os índices calculados com os perfis de RFLP – PCR da região do 16S rRNA evidenciaram diferenças de diversidade entre o PD ($H'=3,12$ e $R1=6,92$) e as demais áreas (PC: $H'=2.86$ e $R1=5.59$; CN: $H'=2.09$ e $R1=3.21$). O número acumulado de perfis indicou maior variabilidade genética no grupo de estirpes provenientes do PD e menor no grupo do CN, em ambas as comparações (estirpes com BOX A1R – PCR e espécies com RFLP – PCR) (Fig. 1).

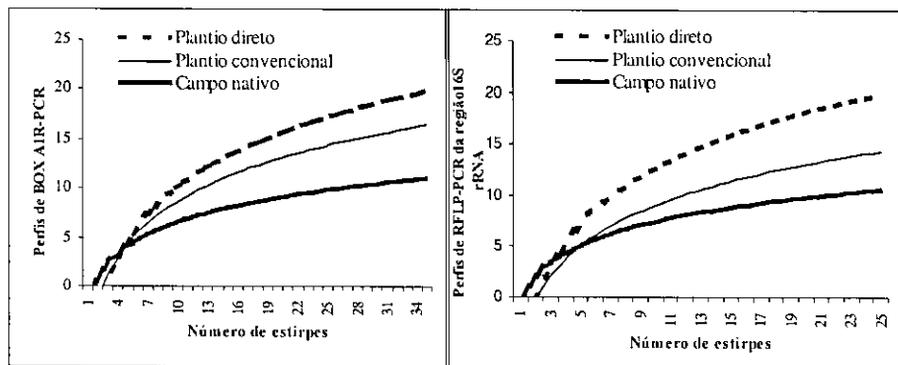


Figura 1. Diversidade acumulada em função do número de rizóbios de feijoeiro avaliados e dos perfis obtidos com as técnicas de BOX A1R - PCR e RFLP - PCR da região 16S rDNA em áreas de lavoura de Campo Belo do Sul, SC sob os sistemas de plantio direto (PD), plantio convencional (PC) e campo nativo (CN).

Considerações Finais

Neste estudo, a diversidade genética de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro foi superior no sistema PD, quando comparada ao sistema PC a ao CN. Os benefícios do PD em relação ao PC, em vários parâmetros microbiológicos, tem sido evidenciado (Hungria & Vargas, 2000) e os menores valores observados no CN resultam do manejo inadequado com fogo no inverno. A maior diversidade microbiana é importante por garantir que as funções dos microrganismos do solo sejam preservadas no ambiente, representando um “efeito tampão”. Os resultados indicam, ainda, a viabilidade de utilizar a diversidade genética de rizóbios com um indicador da qualidade do solo.

Agradecimentos

Projeto parcialmente financiado pela Fundação Araucária (convênio 046/2003) e pelo CNPq (301241/2004-0).

Referências

- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1389-398, 2004.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Dordrecht, v.65, p. 151-164, 2000.
- KASCHUK, G. **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo**. 2003. 79f. Tese. (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.

- MARGALEF, D.R. Information theory in ecology. **General Systems**, v.3, p.36-71, 1958.
- MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.193-205, 1998.
- PIELOU, E.C. **Mathematical Ecology**. New York: Wiley, 1977. 385 p.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949. 117 p.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods of Molecular Cell Biology**, Oxford, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p (IBP Handbook, n°. 15).