

Caracterização genética de rizóbios capazes de nodular feijão-caupi isolados de solos do estado de Roraima⁽¹⁾

Cátia Aparecida Mosqueira⁽²⁾; Alexandre Cardoso Baraúna⁽³⁾; Mariangela Hungria⁽⁴⁾; Jerri Édson Zilli⁽⁵⁾; Krisle da Silva⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa Projeto 02.09.01.023.00.00.

⁽²⁾ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, Centro de Ciências Agrárias (POSAGRO– UFRR/Embrapa Roraima) Boa Vista-RR catia.ap.mosqueira@gmail.com;

⁽³⁾ Aluno de Doutorado; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa Ciência do Solo, Seropédica, RJ alexandre.barauna.bio@gmail.com; ⁽⁴⁾ Pesquisadora, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA-CNPSo), Londrina, PR, Brasil mariangela.hungria@embrapa.br; ⁽⁵⁾ Pesquisador em Microbiologia e Bioquímica do Solo; Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ jerri.zilli@embrapa.br; ⁽⁶⁾ Pesquisadora em Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Boa Vista-RR krisle.silva@embrapa.br.

RESUMO: Considerando as características nutricionais e de rusticidade, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], constitui-se uma das leguminosas de grande importância para o Estado de Roraima e seu cultivo pode ser encontrado em diversas áreas da região. É uma leguminosa que pode se beneficiar do processo de fixação de nitrogênio, podendo receber parte do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento, através da simbiose com bactérias denominadas de rizóbios. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente 31 bactérias isoladas de solo de mata e cerrado no Estado de Roraima capazes de nodular feijão-caupi. Para isto, com o DNA das bactérias extraídos, o gene 16S rRNA foi amplificado, purificado e sequenciado. A partir do sequenciamento pode-se observar similaridade acima de 99% entre as bactérias e os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Também foi possível observar que das 31 bactérias sequenciadas, 20 são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e 11 ao gênero *Rhizobium*, e estes foram encontrados tanto em áreas de mata quanto de cerrado.

Termos de indexação: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Bradyrhizobium* sp; *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

INTRODUÇÃO

Na agricultura atual a busca por novas alternativas de suprimentos às plantas tem sido constante e necessária, tendo em vista o alto custo financeiro para a obtenção de insumos sintéticos. O nitrogênio (N) tem sido um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento e à produção de grãos nas regiões de clima tropical, sendo a fixação biológica

de nitrogênio (FBN) de extrema importância para a produção vegetal (Zilli et al., 2006).

As bactérias fixadoras de nitrogênio são conhecidas por promover o crescimento em diversas culturas de importância agrícola, e seu uso por meio de inoculação tem despertado o interesse dos agricultores, pois minimiza o custo da produção e contribui para o aumento da fertilidade do solo (Soares et al., 2006).

O feijão-caupi é um dos principais componente da dieta alimentar das populações das regiões Nordeste e Norte do Brasil (Zilli et al., 2009). Sendo bastante consumido no Estado de Roraima tanto na forma de grão seco como de vagem verde. É uma cultura de grande importância agrícola, principalmente para os pequenos agricultores que vendem os excedentes nas feiras livres e mercados da Capital.

Nesse contexto o interesse pelo conhecimento das características dos microrganismos existentes nos solos da região Amazônica tem sido crescente, uma vez que ela concentra uma grande diversidade de espécies vegetais e de microrganismos, sobretudo os conhecidos como bactérias fixadoras de nitrogênio (Lima et al., 2005). No entanto devido sua extensão ainda são poucos os conhecimentos sobre a variedade das bactérias que nodulam leguminosas de importância agrônoma. Particularmente, no Estado de Roraima, que apresenta características bem distintas de outras áreas da região Amazônica, como por exemplo, a savana, pouco se conhece da diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

Sendo assim o uso de técnicas moleculares como a região que codifica o 16S rRNA, é importante pois permite a caracterização dos rizóbios, além disso o 16S rRNA é um gene altamente conservado entre as bactérias e têm sido

utilizados como ferramenta de rotina em laboratório para a primeira identificação bacteriana.

Por tanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente 41 bactérias isoladas de solos de mata e cerrado em Roraima capazes de nodular feijão-caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 41 isolados obtidos da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Roraima. Essas bactérias foram previamente isoladas de solos de mata e de cerrado no Estado de Roraima (Tabela 1), utilizando o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] como planta isca (Mosqueira et al., 2011).

Extração de DNA

As bactérias foram crescidas em meio líquido composto de extrato de levedura e manitol (Fred & Waskman, 1928) sobre uma agitação de (150 rpm) a 28°C por 3 dias para bactérias de crescimento rápido, por 4 a 6 dias para bactérias de crescimento intermediário ou lento. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA genômico utilizando-se o kit de extração da RBC® Bioamerica (catálogo: YGB 300).

Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O produto da extração do DNA das 41 bactérias tiveram o gene 16S rRNA amplificado utilizando-se os iniciadores Y1 - 5' TGG CTCAGAACGAACGCTGGCGGC 3' e B3 5' TACCTTGTTACGACTTCACCCCA GCT 3'.

Para 50 µl de reação foram utilizados: 2,0 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 0,12 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95°C por 2 min), 30 ciclos de desnaturação (93°C por 45 s), anelamento (62°C por 45 s), extensão (72°C por 2 min) e uma extensão final (72°C por 5 min).

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR QI Aquick® QIAGEN (Cat. No. 28106) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado utilizando-se o iniciador Y1, o produto purificado através da precipitação com etanol e a corrida realizada em sequenciador 3730xl (Applied Biosystems™).

Análises filogenéticas

As sequências foram submetidas à ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As sequências das bactérias isoladas mais as sequências das estirpes tipos mais similares foram alinhadas utilizando o ClustalW (Higgins et al, 1994). E a árvore filogenética inferida pelo método de Neighbor-joining, utilizando o modelo de Kimura 2 (Kimura, 1980) com 1000 repetições com uso do programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

Tabela 1- Origem dos isolados coletados em área de mata e cerrado do estado de Roraima.

Área	Fito-fisionomia	Coordenadas	Município	N de Bactérias
1		01° 2' 03,6"N 59° 53' 06,5"W	Caracarái (Prop. particular)	ERR 473
				ERR 474
				ERR475
2		02° 36' 07,1"N 60° 57' 01,0"W	Mucajaí (Prop. particular)	ERR 476
				ERR 477
				ERR 478 ERR 479
3		01° 28' 35,1"N 60° 44' 41,2"W	Caracarái (Prop. particular)	ERR 480
				ERR 481
4	Mata	02° 39' 48"N 60° 50' 15"W	Cantá (Campo exper. confiança)	ERR 482
				ERR 483
				ERR 484
5		02° 24' 00"N 60° 58' 37,46"W	Mucajaí (Campo exper. Serra da Prata)	ERR 485
				ERR 486
				ERR 488
				ERR 489
				ERR 490 ERR 491 ERR 492
6	Cerrado	02° 56' 20"N 61° 00' 5"W	Alto alegre (Prop. particular)	ERR 493
				ERR 494
				ERR 496
				ERR 497 ERR 498
7		02° 57' 46"N 60° 42' 20,70"W	Boa Vista (Campo Exper. Monte Cristo)	ERR 500
8		3° 52,57'35"N 59° 36,58' 58,18"W	Normandia (Prop. particular)	ERR 506
				ERR 508
9		02°15'00"N 60°39'54"W	Boa Vista (Campo Exper. Água Boa)	ERR 509
				ERR 510
				ERR 511
				ERR 512

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Plantas, Embrapa-RR

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando submetida ao genbank, as sequências das bactérias apresentaram similaridades acima de 99% com bactérias pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Agrobacterium*.

A partir da sequência do 16S rRNA, pode-se observar que das 31 bactérias sequenciadas, 20 são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e 11 ao gênero *Rhizobium* (Figura 1).

Através da análise filogenética (Figura 1) foi possível observar que dentro das bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, 14 agruparam-se com as estirpes referência *B. elkanii*, *B. lablabi*, *B. jicamae* e *B. pachyrhizi*. As demais bactérias, seis, se agruparam com oito estirpes referência de *B. betae*, *B. canariense*, *B. cytisi*, *B. denitrificans*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. liaoningense* e *B. yuanmingense*. Estes dados demonstram que boa parte das bactérias que nodulam o feijão-caupi tem sido do gênero *Bradyrhizobium*, o qual abrange um número grande de estirpes capazes de nodular várias espécies de leguminosas herbáceas comuns em região tropical (Zilli et al., 2004; 2006).

Dentro do gênero *Rhizobium*, quatro bactérias (ERR 511, ERR 484, ERR 479, ERR 477) foram muito próximas à estirpe tipo de *Rhizobium pusense* (Figura 1). Já seis bactérias foram próximas a estirpe tipo de *R. hainanense* e uma bactéria próxima a *R. etli* e *Agrobacterium rhizogenes*.

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* foram encontradas tanto na área de mata quanto de cerrado.

Em trabalhos na Amazônia com bactérias fixadoras de nitrogênio utilizando o feijão-caupi como planta isca tem revelado a predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, mas estes também detectaram a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Guimarães et al., 2012). O que foi semelhante ao encontrado neste estudo.

O gene 16S rRNA é uma ferramenta importante para uma primeira identificação de bactérias. Embora o sequenciamento parcial desse gene contribua com a disponibilização de diversas informações, por se tratar de um gene altamente conservado não é possível a diferenciação entre espécies próximas (Williems et al., 2003) Sendo assim, torna-se essencial o uso de outras técnicas.

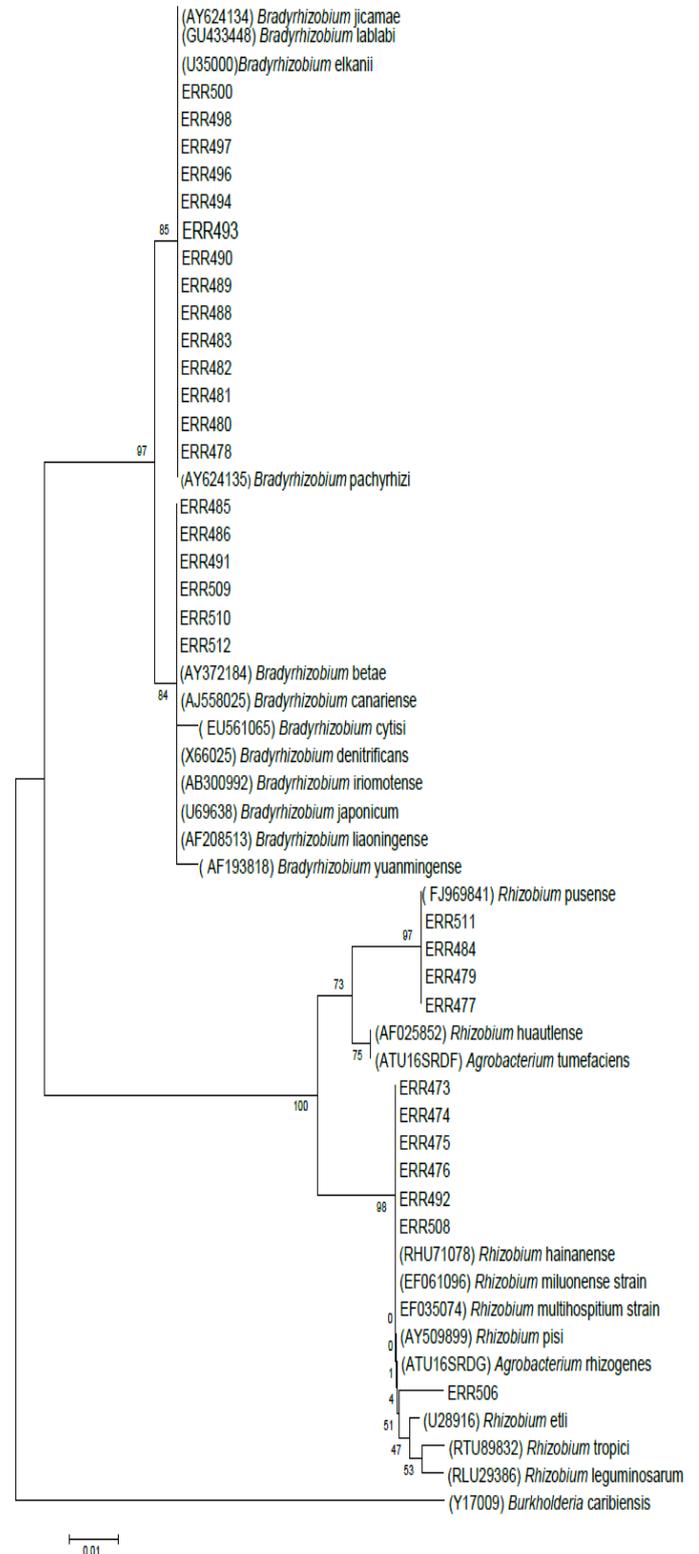


FIGURA 1. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados obtidos em solos de mata e cerrado em Roraima e estirpes tipo dos gêneros. Obtidas no Genbank.



CONCLUSÃO

As bactérias isoladas de solos de mata e cerrado em Roraima pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo. À Embrapa Roraima e a Universidade Federal de Roraima pelo espaço físico e apoio financeiro que viabilizaram essa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, p.145, 1928.
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, D. P. M.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, A. L.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6726–6733, 2012.
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.11, p.1095-1104, 2005.
- MOSQUEIRA, C. A. Caracterização Fenotípica e Eficiência Simbiótica de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Capazes de Nodular Feijão-Caupi. Monografia (Graduação em Agronomia) – Faculdade Roraimense de Ensino Superior, Boa Vista, 2011.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S.; Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). i – caupi - *Revista Brasileira Ciência d. Solo*, 30:795-802, 2006.
- TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011.
- WILLEMS, A.; MUNIVE, A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA–DNA hybridizations. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 203–210, 2003.
- ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 35:281-287. 2004.
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FILHO, F. R. F.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.41, n.5, p.811-818, maio 2006.
- ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira. *Boa Vista: Embrapa Roraima*, p.356, 2009.