

## Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob sistema agrícola na Amazônia Ocidental<sup>(1)</sup>.

**Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(2)</sup>, Amanda Azarias Guimarães<sup>(3)</sup>; Paula Marcela Duque Jaramillo<sup>(4)</sup>; Rafaela Simão Abrahão Nóbrega<sup>(5)</sup>; Ligiane Aparecida Florentino<sup>(6)</sup>; Karina Barroso Silva<sup>(7)</sup>.**

<sup>(1)</sup>Trabalho executado com recursos de projeto GEF/UNEP-GF2715-02 (CSM-BGBD/BiosBrasil-www.biosbrasil.ufla.br).  
<sup>(2)</sup> Professora Associada do Departamento de Ciência do Solo; Universidade Federal de Lavras; Lavras, Minas Gerais; fmoreira@dcs.ufla.br; <sup>(3)</sup> Pós-doutoranda; Universidade Federal de Lavras; <sup>(4)</sup> Estudante de doutorado; Universidade de Brasília; <sup>(5)</sup> Professora; Universidade Federal do Piauí; <sup>(6)</sup> Professora; UNIFENAS – Universidade José do Rosário Vellano; <sup>(7)</sup> Estudante de doutorado; Universidade Federal de Lavras.

**RESUMO:** O Feijão-caupi é uma leguminosa de grande importância agrônômica que estabelece relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio. No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade genética destas bactérias simbióticas em ecossistemas distintos. No presente estudo avaliou-se a diversidade genética e eficiência simbiótica de 119 estirpes de bactérias isoladas de solos agrícolas na Amazônia Ocidental, utilizando feijão-caupi como planta isca. As estirpes foram agrupadas em 11 grupos culturais, de acordo com taxa de crescimento e pH. As 57 estirpes que não nodularam são predominantemente de crescimento rápido e acidificam o meio de cultura, indicando uma alta incidência de estirpes endofíticas nos nódulos. As outras 62 estirpes autenticadas apresentaram resultados variáveis em relação à eficiência simbiótica. Foram obtidos 50 genótipos a 70% de similaridade e 21 genótipos a 30% de similaridade, por meio do grupamento dos perfis de BOX-PCR, indicando alta diversidade genética das estirpes isoladas de solos sob Agricultura na Amazônia Ocidental. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes representantes dos genótipos obtidos no BOX-PCR demonstrou uma predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, com alta diversidade de espécies. Foram identificadas também bactérias dos gêneros: *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Achromobacter*. Estes resultados confirmam a promiscuidade do feijão-caupi e demonstram a alta diversidade genética de rizóbios e espécies simbióticas em áreas sob cultivo na Amazônia Ocidental.

**Termos de indexação:** Biodiversidade; BOX-PCR; 16 rRNA

### INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica abrange 60% do território nacional, com 5.000.000 km<sup>2</sup>, aproximadamente. Essa é uma região de grande extensão territorial,

da qual se conhece a diversidade da fauna e flora, e pouco se sabe sobre a microbiota do solo. Os poucos estudos existentes sobre o assunto sugerem um elevado nível de diversidade entre as bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam diferentes espécies de leguminosas encontrados nesta região (Moreira et al., 1993; Jesus et al., 2009; Lima et al., 2005).

Em estudos sobre a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL), o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é muito utilizado como planta isca, pois além de ser uma cultura de importância agrônômica, é considerada uma planta promiscua, ou seja, capaz de estabelecer simbiose com diferentes gêneros e espécies de BFNNL (Moreira, 2008), com eficiência simbiótica variável (Lima et al., 2005).

Por muito tempo, considerou-se que devido a essa promiscuidade, o feijão-caupi não respondia bem à inoculação com estirpes selecionadas no campo. No entanto, experimentos mostraram resultados significativos com estirpes isoladas da Amazônia pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006) em solos de Minas Gerais. Estas estirpes são atualmente aprovadas como inoculantes pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para essa espécie e têm sido testadas com sucesso em outras regiões do país (Chagas Junior et al., 2010). Isto demonstra que a avaliação da diversidade e eficiência simbiótica de estirpes nativas representam um importante passo para a obtenção de estirpes inoculantes.

Para a caracterização inicial e triagem destes microrganismos as características culturais são utilizadas com sucesso, porém técnicas moleculares como BOX-PCR e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, entre outras, são mais recomendadas, por apresentarem resultados mais precisos com relação à avaliação da diversidade e identificação.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar

a diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos da planta isca feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] de solos sob cultivo agrícola na região do Alto Solimões, Amazônia Ocidental.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem da estirpes

As 119 estirpes avaliadas no presente estudo foram isoladas de nódulos de feijão caupi em experimento prévio. No qual, amostras de solo foram coletadas em áreas sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental e inoculadas em plantas de feijão caupi, utilizadas como planta isca. Posteriormente, foi realizada a caracterização cultural de cada estirpe em meio de cultura 79, seguindo especificações descritas em Moreira et al. (1993) e Jesus et al. (2005).

Para determinar os grupos de similaridade fenotípica foram utilizadas somente a alteração do pH no meio de cultura e tempo de crescimento

### Autenticação das estirpes e eficiência simbiótica

O experimento de autenticação e eficiência simbiótica das 119 estirpes, utilizando feijão caupi (cultivar BR17 Gurguéia) como planta isca, foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras, como descrito em Guimarães et al. (2012)

Para verificar a eficiência simbiótica, os seguintes parâmetros foram determinados 35 dias após a instalação do experimento: matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e eficiência relativa (ER%).

Os dados foram analisados seguindo a normalidade. Foram realizadas análise de variância (ANOVA), com o número de nódulos (NN) transformado com a raiz quadrada de  $(x + 1)$ , tal como recomendado pelo SAS Learning Edition 2.0. Os valores médios foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância usando SISVAR.

### Caracterização da diversidade genética por meio do BOX-PCR

A diversidade genética das 62 estirpes autenticadas foi avaliada pelo BOX-PCR. Além das 62 estirpes, foram incluídas as seguintes estirpes tipos: *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424<sup>T</sup>), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Azorhizobium doebereineriae* (BR5401<sup>T</sup>), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84), *Mesorhizobium plurifarum* (BR3804),

and *Azorhizobium caulinodans* (ORS571<sup>T</sup>). A reação e os ciclos de amplificação estão descritos em Guimarães et al. (2012).

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela observação da presença ou ausência de bandas polimórficas no gel. Os dados foram agrupados utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pairgroup Mean Arithmetic Method) e o coeficiente de Jaccard por meio do software BioNumerics 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

### Caracterização da diversidade genética por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

Entre as estirpes autenticadas foram selecionados, aleatoriamente, 23 representantes de oito grupos culturais para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo o protocolo do Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA (Zymo Research Corp). A reação e os ciclos de amplificação estão descritos em Guimarães et al. (2012).

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com filtros Microcon<sup>TM</sup> (Millipore), sendo posteriormente sequenciados, utilizando o iniciador 27F em sequenciador 3730xl.

A qualidade das sequências obtidas foram verificadas no Phred e submetidas ao "Basic Local Alignment Search Tool"- BLAST para comparação com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank. Somente sequências com mais de 600 pares de bases foram usadas na análise filogenética. O alinhamento destas foi realizado com ClustalW e a árvore filogenética foi obtida por meio do método neighbor-joining, utilizando o modelo de Kimura 2, parâmetros encontrados no MEGA versão 5. Uma análise de confiança bootstrap foi realizada com 1000 repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 119 estirpes testadas neste trabalho foram separadas em grupos de similaridade fenotípica quanto ao tempo de crescimento (aparecimento de colônia isolada) e à alteração do pH do meio de cultura, sendo formados 11 fenótipos diferentes: crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento intermediário e pH ácido (IA); crescimento intermediário e pH neutro (IN); crescimento intermediário e pH alcalino (IAL); crescimento intermediário e pH ácido ou neutro (IAN); crescimento lento e pH ácido (LA); crescimento lento e pH neutro (LN); crescimento

lento e pH alcalino (LAL); crescimento lento e pH ácido ou neutro (LAN).

No experimento conduzido em casa de vegetação foi observado que 62 (51%) foram capazes de nodular as plantas de feijão caupi. Dentre estas as estirpes UFLA 03-214, UFLA 03-142, UFLA 03-200, UFLA 03-183 e UFLA 03-195, juntamente com as estirpes referência UFLA 03-11b e a BR 3267, se destacaram em relação NN. A ER% das estirpes foi classificada de acordo com os grupos identificados pelo teste de Scott-Knott a 5% de similaridade em: eficiente (grupo "b"), eficiência intermediária (grupos "c" e "d"), baixa eficiência (grupo "e") e ineficiente (grupos "f", "g" e "h"). Estes últimos representaram 30% dos isolados estudados e não diferiram significativamente ou apresentaram valores inferiores ao controle sem inoculação e com baixo teor de N. Os demais isolados agruparam-se às estirpes referência UFLA 03-84 (grupo e), INPA 03-11B (grupo d) e BR 3267 (grupo b).

Os resultados de eficiência simbiótica para os tratamentos com inoculação das estirpes recomendadas como inoculante para feijão caupi, UFLA 3-84 (baixa eficiência), INPA 3-11b (eficiência intermediária) e BR 3267 (eficiente), podem estar relacionados às altas temperaturas registradas no período em que o experimento foi instalado. Houve dias em que a temperatura máxima registrada externa à casa de vegetação aproximou de 35°C (INMET, 2008), portanto a temperatura interna foi bem mais elevada. Um dos fatores que pode afetar o processo de infecção de BFNNL é a elevação da temperatura a valores acima de 34°C, sendo que plantas adubadas com N mineral apresentam maior tolerância aos estresses abióticos em relação às plantas cuja aquisição desse nutriente se origina da fixação biológica de nitrogênio (Moreira, 2006).

Entre as estirpes consideradas eficientes estão duas do gênero *Achromobacter* (UFLA 03-205 e UFLA 03-202) e duas do gênero *Bradyrhizobium* (UFLA 03-145 e UFLA 03-150). Sendo que este último é o gênero das bactérias recomendadas como inoculantes para feijão-caupi.

Em relação à diversidade genética, foi verificada alta diversidade entre as 52 estirpes das 62 que estabeleceram simbiose com feijão-caupi, por meio do BOX-PCR.

A 70% de similaridade, foram formados 50 genótipos, sendo que a maioria destes é constituída por apenas uma estirpe. A similaridade com as estirpes referência ou tipo, BR 5401 (*Azorhizobium dobereineriae*), ORS 571<sup>T</sup> (*Azorhizobium caulinodans*), LMG19424<sup>T</sup> (*Cupriavidus taiwanensis*), BR3405 (*Burkholderia sabiae*),

BR3804 (*Mesorhizobium*), UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) e INPA 03-11B (*Bradyrhizobium ellkanii*), que foram utilizadas para comparação, foi menor que 50%. Somente dois grupos foram formados com 100% de similaridade: UFLA 03-148/UFLA03-176 e UFLA 03-173/UFLA 03-150. O BOX-PCR mostrou alta diversidade genética entre estirpes no SUT Agricultura, corroborando com resultados encontrados por outros autores (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009), os quais observaram maior diversidade em áreas de cultivo agrícola em relação à floresta primária, podendo ser justificado pela maior demanda de nitrogênio em áreas de cultivo que estimulam a nodulação e consequentemente a proliferação de rizóbio (Moreira e Franco, 1994).

Foi realizada a análise filogenética de sequências do gene 16S rRNA de 23 estirpes que nodularam feijão-caupi, representantes de oito grupos culturais (RA, RAL, IA, IN, IAL, LA, LN e LAL) e de nove genótipos obtidos pelo agrupamento de perfis por meio do BOX-PCR a 30% de similaridade, com sequências depositadas no banco de dados GenBank, de espécies conhecidas de  $\alpha$ -Proteobactérias e  $\beta$ -Proteobactérias. A similaridade das estirpes em estudo com os acessos no GenBank variaram de 97 a 100%.

A maioria das estirpes foi identificada como sendo do gênero *Bradyrhizobium*. No entanto, outros gêneros foram identificadas entre as estirpes sequenciadas: *Rhizobium* (UFLA2-186, UFLA2-188), *Burkholderia* (UFLA2-216) e *Achromobacter* (UFLA 03-205, UFLA 03-183, UFLA 03-206 e UFLA 03-202).

A alta diversidade genética observada neste estudo, no SUT Agricultura, já havia sido verificada por Lima et al. (2009) quando avaliou a diversidade de bactérias capturadas pela planta isca Siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Porém, esta autora verificou maior diversidade de gêneros de bactérias que fixam nitrogênio em leguminosas (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium*, *Burkholderia*), enquanto no presente trabalho verificou-se maior diversidade ao nível de espécie, dentro do gênero *Bradyrhizobium*, além do gênero *Achromobacter*. A predominância de bactérias de crescimento lento, que alcalinizam o meio de cultura ou mantém o pH neutro, características do gênero *Bradyrhizobium*, que nodulam feijão-caupi já foram observadas por outros autores (Zilli et al., 2004; Florentino et al., 2010).

## CONCLUSÕES





As estirpes isoladas de solos agrícolas naregião da Amazônia Ocidental apresentaram altadiversidade genética e simbiótica.

As estirpes apresentaram eficiência semelhante às estirpes aprovadas como inoculante para feijão caupi, demonstrando o potencial como inoculantes.

O BOX-PCR foi eficiente na discriminação entre estirpes, mostrando alta diversidade genética entre as estirpes, principalmente do gênero *Bradyrhizobium*.

Estirpes do gênero *Achromobacter* também são capazes de nodular feijão caupi e são eficientes na fixação biológica de nitrogênio.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudos. Ao CNPq, Fapemig ao projeto GEF/UNEP-GF2715-02 (CSM-BGBD) pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

### REFERÊNCIAS

CHAGAS-JUNIOR AF, OLIVEIRA LA, OLIVEIRA AN.. Phenotypic characterization of rhizobia strains isolated from Amazonian soils and symbiotic efficiency in cowpea. *Acta Sci. Agron.* 32:161–169, 2010.

FLORENTINO LA, SOUSA PM, SILVA JS, SILVA KB, MOREIRA FMS. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as the trap species. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34:1113–1123, 2010.

GUIMARÃES AA, JARAMILLO PMD, NÓBREGA RSA, FLORENTINO LA, SILVA KB, MOREIRA FMS. 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*, 78:6726-6733, 2012.

JESUS EC, MARSH TL, TIEDJE JM, MOREIRA FMS.. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *International Society for Microbial Ecology*, 3:1004–1011, 2009.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 40:769-776, 2005

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. *Revista Ceres*, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitium atropurpureum*). *Plant Soil* 319:127–145, 2009.

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.

MOREIRA FMS, FRANCO AA.. Rhizobia—host interactions in tropical ecosystems in Brazil, 1994, p 63–74. In Sprent JI, Mckey D (ed), *Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor*. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom.

MOREIRA FMS, GILLIS M, POT B, KERSTERS K, FRANCO AA. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, 16:135-146, 1993.

MOREIRA FMS. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria, 2006, p.237–270. In: Moreira FMS, Siqueira JO, Brussaard L (ed), *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*. CAB International, Wallingford. United Kingdom.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. *Lavras*: Ed. UFLA, 2008. 768 p.

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 de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 30:795-802, 2006.

Zilli JE, Valisheski RR, Freire Filho FR, Neves MCP, Rumjanek NG. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:281–287, 2004.



# XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO

28 de julho a 2 de agosto de 2013 | Costão do Santinho Resort | Florianópolis | SC