

Diversidade genética de rizóbios isolados de angico (*Anadenanthera colubrina*) em áreas de Caatinga do Semiárido Pernambucano⁽¹⁾

Dalila Ribeiro Rodrigues⁽²⁾; Katherine Gomes Oliveira⁽³⁾; Rejane de Carvalho Nascimento⁽⁴⁾; Indra Elena Costa Escobar⁽⁵⁾; Ana Dolores Santiago de Freitas⁽⁶⁾; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁽⁷⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq e Embrapa

⁽²⁾ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, dalilaribeiro_bio@hotmail.com. ^(3,4) Estudante de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. ⁽⁵⁾ Bolsista PNPd, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale São Francisco. ⁽⁶⁾ Professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco. ⁽⁷⁾ Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Semiárido.

RESUMO: A utilização de leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio nativas eficientes e competitivas favorecem o estabelecimento das plantas, reduz os custos da implantação e manutenção dos sistemas agrícolas dispensando a utilização de fertilizantes químicos, além de representar uma estratégia potencial na regeneração de áreas degradadas. Mas, para o sucesso destas práticas é preciso conhecer a diversidade das bactérias presentes nos nódulos de tais espécies de leguminosas. Os isolados foram obtidos através da utilização do Angico como planta-semeado em solos de áreas de regeneração de Caatinga no Semiárido Pernambucano. Como critério de seleção dos isolados foi utilizada a técnica de Duplex-PCR para prosseguir com os estudos de diversidade através do ARDRA, foram utilizadas as endonucleases *HinfI* e *AluI* para caracterizar a diversidade genotípica dos isolados. A análise de restrição demonstrou a diversidade por localização das bactérias isoladas e sua baixa similaridade com as estirpes de referência, sugerindo a existência de isolados pertencentes a novos grupos capazes de nodular o Angico.

Palavras-Chave: Fixação Biológica de Nitrogênio; Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado; Áreas de regeneração.

INTRODUÇÃO

Dentre as bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio destacam-se o grupo dos rizóbios, que possuem a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas (Chaintreuil et al., 2013) sendo reconhecidos como os principais fixadores de nitrogênio atmosférico. Tornando-as mais relevante no cenário mundial como uma alternativa à fertilização química.

Os fixadores de nitrogênio apresentam uma grande diversidade cultural, fisiológica, genética e filogenética, são encontrados em ambientes aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos,

podendo ser de vida livre, associativos ou simbióticos (Moreira & Siqueira, 2006; Santi et al., 2013).

Além de aplicações agrônômicas, medicinais e industriais, diversas leguminosas podem ser utilizadas como espécies potenciais para a regeneração de áreas degradadas (RAD). Dentre as espécies leguminosas nativas o Angico (*Anadenanthera colubrina*) representa uma espécie de grande relevância por possuir rapidez na germinação, ausência de dormência e alta germinabilidade em ampla faixa de temperatura e por serem plantas com resistência ao dessecamento graças à presença do órgão de reserva (Maia, 2004). Sendo estes uns dos principais fatores citados por Prestes (2007) para escolha de espécies promissoras para RAD.

O potencial de leguminosas para a utilização nos sistemas RAD torna-se relevante devido a associação simbiótica na maioria das espécies de leguminosas com fixadoras de nitrogênio (Moreira & Siqueira, 2006).

Para obtenção de melhores resultados faz-se necessária uma seleção de micro-organismos eficientes e competitivos para a inoculação em espécies leguminosas arbóreas nativas (Martins et al., 2015), visando um melhor estabelecimento e desenvolvimento em áreas de regeneração.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos de Angico em diferentes áreas de regeneração do Semiárido Pernambucano.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados rizobianos

As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas de plantas de angico (*Anadenanthera colubrina*) cultivadas em vasos com amostras superficiais de solos provenientes de áreas regeneradas de Pernambuco, nas cidades de Caruaru (S 8° 16' 53"; O 35° 58' 25"), Garanhuns (S

8° 53' 27"; O 36° 29' 48") e Serra Talhada (S 7° 59' 7"; O 38° 17' 34"). Para a implantação do ensaio, as sementes de angico foram escarificadas e desinfestadas superficialmente com etanol comercial (30 segundos), peróxido de hidrogênio (3 minutos) e 10 lavagens com água destilada autoclavada (Vincent, 1970), em seguida foram plantadas em vasos com capacidade para 1L de solo. As plantas receberam água conforme necessário e foram cultivadas por um período de 120 dias quando foram colhidas, suas raízes lavadas e seus nódulos destacados.

O isolamento das bactérias dos nódulos foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. Os nódulos foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1% e em seguida esmagados com o auxílio de uma pinça e riscados em Placas de Petri contendo meio YMA com Vermelho Congo. As placas foram incubadas a 28 °C. Ao se constatar o crescimento das colônias deu-se início ao processo de purificação em placa de Petri contendo meio YMA com Azul de Bromotimol.

Caracterização genotípica

Os isolados obtidos tiveram o seu DNA genômico extraído a partir de culturas de células, de acordo com o protocolo alternativo de extração de DNA, e a partir da extração feito o Duplex-PCR do *nifH* e *nodC* (Fernandes Júnior et al., 2013). Para cada reação duas estirpes de rizóbio eram utilizadas como controle positivo. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V por 120 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) e a visualização do gel realizada em um transluminador sob luz UV. De acordo com os resultados obtidos através do Duplex-PCR foram selecionados 19 isolados que amplificaram ao menos um dos fragmentos dos genes *nifH* e/ou *nodC* para caracterização do perfil de restrição de DNA pela técnica de Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA). Para comparação dos resultados foram incluídas 4 estirpes como referências obtidas da coleção de isolados da Embrapa Semiárido: *Burkholderia sabiae* (BR 3407T), *Bradyrhizobium sp.* (BR 3262), *Rhizobium tropici* (CIAT 899T) e *Ensifer sp.* (BR 4007).

A reação final de PCR foi redimensionada para 35µl contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 3,0 mM, dNTP 1,0 mM, 1,0 U Taq DNA polimerase, água, 0,75 µM de cada primer iniciador. Os iniciadores utilizados foram o 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991). A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por

35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final 72°C por 5 min.

Para análise de restrição foram utilizadas as endonucleases *Hinf I* e *Alu I*, seguindo as orientações do fabricante. O DNA digerido foi analisado em gel horizontal a 3% de agarose em tampão TAE 1X por duas horas, em uma voltagem constante de 110V. Os perfis dos fragmentos de restrição foram utilizados para realizar uma análise de agrupamento utilizando o coeficiente de Jaccard, o algoritmo UPMGA pelo programa BioNumerics 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando os resultados da análise de restrição (ARDRA), todos os isolados e as estirpes de referência apresentaram apenas 5% de similaridade. No dendrograma de similaridade (Figura 1) os isolados foram agrupados por localização geográfica tornando possível verificar a presença de 3 grandes grupos distintos.

O grupo 1, com aproximadamente 35% de similaridade, agrupou 17 isolados de Angico e as estirpes *Burkholderia sabiae* (BR 3407T), *Bradyrhizobium sp.* (BR 3262), dentre eles três isolados (A21, A34 e A35) apresentam 100% de similaridade. Dois isolados, A37 e A22, são de localidades diferentes e apresentam 80% de similaridade.

O agrupamento 2 composto por 6 isolados de Angico e a estirpe *Rhizobium tropici* (CIAT 899T) possui uma similaridade de 40%. Houve a formação de 2 subgrupos com 100% de similaridade entre os isolados A50 e A80 (2A) provenientes de Serra Talhada e entre os isolados A4 e A52 (2B) provenientes de Caruaru, e uma similaridade de aproximadamente 60% entre as localidades para os mesmos isolados.

O grupo 3 composto por cinco isolados de Angico, provenientes de Serra Talhada, e pela estirpe *Ensifer sp.* (BR4007) apresentam 10% de similaridade. O subgrupo 3A formado apenas pelos isolados de Angico apresentam 40% de similaridade. Dois isolados, A13 e A30, possuem 100% de similaridade.

Os isolados de Angico possuem grande diversidade quando comparadas as estirpes de referência, sugerindo então a existência de isolados pertencentes a novos grupos capazes de nodular esta espécie.

Resultados semelhantes obtidos por Lima et al. (2012) em estudos com *Mucuna pruriens* e *Mucuna deeringiana* apontaram uma grande diversidade entre os isolados e as estirpes de referência.

Estudos realizados por Freitas et al. (2014) com espécies de *Mimosa spp.* foi equivalente ao presente estudo onde ambos demonstram uma



gama de diversidade entre as localidades estudadas separadas por grupos de isolados distintos.

CONCLUSÃO

Os isolados apresentam diversidade significativa entre as localidades;

A baixa similaridade com as estirpes de referência sugerem a existência de isolados pertencentes a novos grupos capazes de nodular o Angico.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Embrapa Semiárido e ao Programa de Pós-graduação de Ciências Agrárias da Universidade estadual da Paraíba.

REFERÊNCIAS

CHARENTREUIL, C.; ARRIGHI, J. F.; GIRAUD, E.; MICH, L.; MOULIN, L.; DREYFUS, B.; HERANDEZ, J. A. M.; HERNANDEZ, M. DEL C. V.; BENA, G. Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. *New Phytologist*, 200: 1247–1259. 2013.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes *nifH* e *nodC* em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas. *Petrolina: Embrapa Semiárido, Comunicado técnico: 158, 6 p.* 2013

FREITAS, A. D. S.; DE BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. DE M.; SAMPAIO, E. V. DE S. B.; SANTOS, C. E. DE R. E S.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M. DO C. C. P. DE. Characteristics of nodule bacteria from mimosa spp grown in soils of the brazilian semiarid region. *African journal of microbiology research*. 8: 788-796. 2014.

LANE D. J. 16S/23S rRNA sequencing. in *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. eds Stackebrandt E., Goodfellow M. (John Wiley and Sons Ltd. Chichester, United Kingdom). 115–175. 1991.

LIMA, A. A. DE.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; DE PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M. DE.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*. *Revista Brasileira de ciência do solo*. 36: 337-348. 2012.

MARTINS, P.G.S.; LIRA JUNIOR, M.A.; FRACETTO, G.G.M.; SILVA, M.L.R.B.; VICENTIN, R.P.; LYRA, M.C.C.P. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from

different origins of the Brazilian Northeast, *Archives of Microbiology*, DOI 10.1007/s00203-014-1078-8, 2015.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z. 104-114. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ed.: UFLA. 2006. 726p.

PRESTES, M. T. Efeitos de diferentes doses de esterco de gado, no desenvolvimento e no balanço nutricional de mudas de angico (*Anadenanthera macrocarpa*). 2007. 62f. *Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)* - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111: 743–767. 2013.

VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific. 1970. 164p.

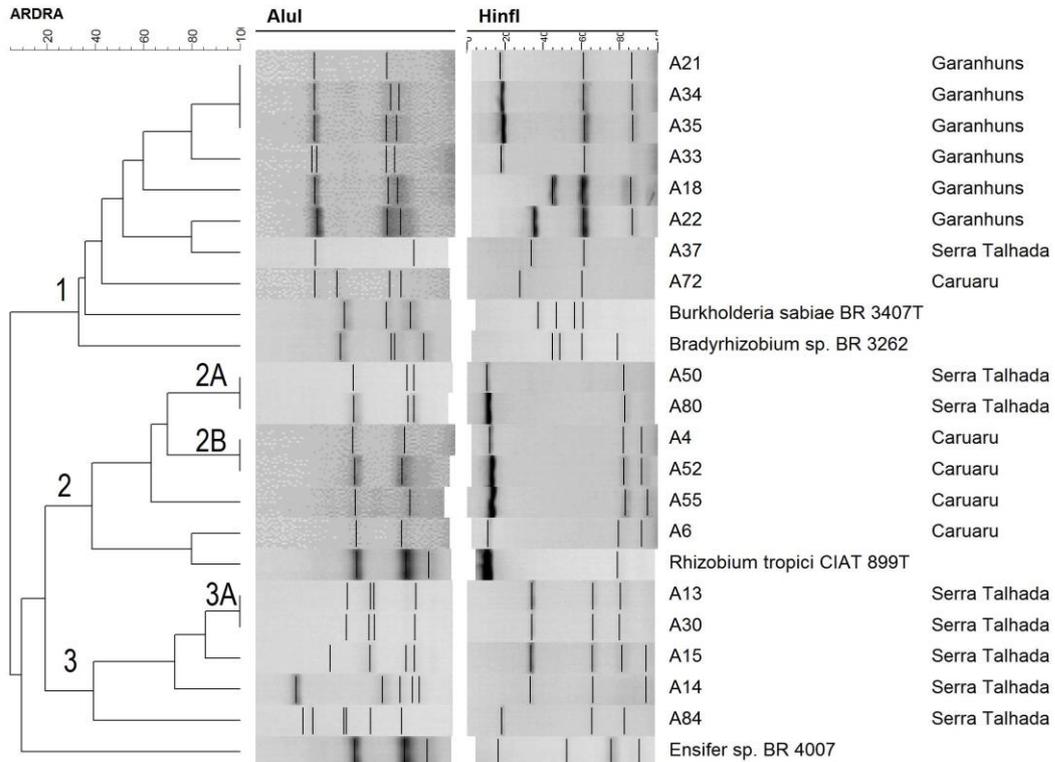


Figura 1. Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de nódulos de Angico e 4 estirpes de referência por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *HinfI* e *AluI*.