



Diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-fava em solo do Piauí⁽¹⁾

Paula Rose de Almeida Ribeiro⁽²⁾; Elaine Martins da Costa⁽³⁾; Fernanda de Carvalho⁽⁴⁾; Fatima Maria de Souza Moreira⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq, CAPES e FAPEMIG; ⁽²⁾ Pós-doutoranda, Bolsista VALE/FAPEMIG, Departamento de Ciência do Solo (DCS), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, paularoseribeiro@gmail.com; ⁽³⁾ Doutoranda, Bolsista CNPq, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, DCS/UFLA, elainemartins20@hotmail.com; ⁽⁴⁾ Pós-doutoranda, Bolsista CNPq/PNPD, DCS/UFLA, fernandacarva@hotmail.com; ⁽⁵⁾ Professora titular, DCS/UFLA, bolsista de produtividade nível 1A do CNPq, fmoreira@dcs.ufla.br

RESUMO: O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma importante espécie leguminosa capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL). No entanto, pouco se conhece em relação à diversidade de BFNNL isoladas dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos do feijão-fava cultivado em solo do Piauí. Foram coletados nódulos de 10 plantas (10 nódulos por planta) de feijão-fava cultivado em campo na comunidade primavera em Santa Luz, PI. Posteriormente, 6 nódulos por planta foram selecionados para isolamento das estirpes. Após a purificação das estirpes, realizou-se a caracterização morfológica a extração do DNA. Para a identificação taxonômica, foi realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Estirpes isoladas de nódulos de feijão-fava apresentaram alta diversidade, com identificação de gêneros nodulíferos (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) e endofíticos (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Inquilinus* e *Paenibacillus*). *Bradyrhizobium* foi o gênero de maior ocorrência. Nosso trabalho, é o primeiro a identificar, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, estirpes de BFNNL isoladas de nódulos do feijão-fava, no Brasil.

Termos de indexação: *Phaseolus lunatus* L, *Bradyrhizobium*, bactérias fixadoras de nitrogênio

INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é a segunda espécie socioeconomicamente mais importante do gênero *Phaseolus* no mundo. Essa cultura é uma das principais fontes de proteína para alimentação humana e animal no Nordeste brasileiro, que concentra cerca de 95% da produção nacional (IBGE, 2009). No entanto, a maior parte da sua produção é proveniente de pequenos produtores, sem adoção de tecnologias, o que resulta em uma produtividade de apenas 420 kg ha⁻¹ (IBGE, 2009).

Uma importante característica do feijão-fava é a sua capacidade de estabelecer simbiose com

bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL). Entretanto, a diversidade genética de BFNNL isoladas de nódulos dessa leguminosa tem sido pouco estudada, existindo apenas três trabalhos no mundo, nos quais o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou maior ocorrência do gênero *Bradyrhizobium* (Ormeño-Orrillo et al., 2006; López-López et al., 2013; Matsubara & Zúñiga-Dávila, 2015). Em outro estudo, não relacionado à diversidade de BFNNL, uma estirpe isolada de nódulos de feijão-fava foi identificada como *Sinorhizobium meliloti* (Ormeño-Orrillo et al., 2007).

Em ecossistemas brasileiros, o gênero *Bradyrhizobium* tem sido apontado como o microssimbionte mais abundante identificado em nódulos do feijão-caupi (Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013). No entanto, para o feijão-fava existe apenas um estudo no Brasil em relação à diversidade de BFNNL, no qual a maioria dos isolados apresentou reação ácida em meio 79 (Santos et al., 2011). Nesse estudo, foram identificados os gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e principalmente *Rhizobium*, baseando-se na análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA), no entanto, essa classificação taxonômica não foi confirmada através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Considerando a importância socioeconômica do feijão-fava, novos estudos são necessários na perspectiva de acessar a diversidade de BFNNL associadas a essa cultura, que podem representar importantes fontes de recursos genéticos com potencial de aplicação como inoculantes para aumentar a sua produtividade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos do feijão-fava cultivado em solo do Piauí.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área de coleta dos nódulos e isolamento das estirpes



Em janeiro de 2015 foram coletados nódulos (10 nódulos por planta) de 10 plantas de feijão-fava (aos 45 dias após o plantio) cultivadas no campo, em consórcio com milho, na comunidade primavera (8°55'9,18"S 44°9'45,10"W), município de Santa Luz, PI. Essa área tem sido utilizada, por cerca de 20 anos, adotando-se sistemas de consórcios (milho com feijão-fava ou com feijão-caupi) e rotação com *Andropogon gayanus*, sem histórico de aplicação de fertilizantes químicos e inoculantes microbianos. Dez amostras simples do solo da área estudada foram coletadas na profundidade de 0 a 20 cm para formar uma amostra composta, a qual apresentou as seguintes características: pH em H₂O 7,5; P (Mehlich 1) 23,77 mg dm⁻³; K⁺ 296,00 mg dm⁻³; Ca²⁺ 2,77 cmol_c dm⁻³; Mg²⁺ 0,51 cmol_c dm⁻³; Al³⁺ 0,00 cmol_c dm⁻³; H +Al 0,76 cmol_c dm⁻³; soma de bases 4,04 cmol_c dm⁻³; CTC efetiva 4,04 cmol_c dm⁻³; CTC potencial 4,80 cmol_c dm⁻³; saturação por alumínio 0,00%; saturação por bases 84,15%, matéria orgânica 1,64 dag kg⁻¹; argila 41 dag kg⁻¹; silte 14 dag kg⁻¹ e areia 45 dag kg⁻¹.

Os nódulos de cada planta foram armazenados em frascos hermeticamente fechados com sílica gel e algodão. Posteriormente, foram selecionados 6 nódulos de cada planta (totalizando 60 nódulos) para realização do isolamento das bactérias. Os nódulos foram hidratados em água destilada estéril e, posteriormente, submetidos à desinfestação: imersão em álcool (95%) por 30 segundos, imersão em H₂O₂ por 3 minutos e seis lavagens em água destilada estéril. Em seguida, foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 sólido (Fred & Waksman, 1928) e o material foi espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas. Após a purificação dos isolados, realizou-se a caracterização cultural em meio 79. As características analisadas foram: tempo de crescimento, rápido (1-3 dias), intermediário (4-5 dias), lento (6-10 dias); alteração do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro).

Identificação genética das estirpes

A extração de DNA das estirpes foi realizada pelo método de lise alcalina (Niemann et al., 1997) após o crescimento em meio de cultura 79 (2 dois dias para estirpes de crescimento rápido e 5 dias para estirpes de crescimento lento).

A amplificação parcial do gene 16S rRNA, primers, condições dos ciclos e sequenciamento foram os mesmos utilizados por Costa et al. (2013).

A qualidade das sequências foi avaliada usando o programa BioNumerics (versão 7.1) e, posteriormente, foram submetidas ao "*Basic Local Alignment Search Tool*" para comparação com sequências similares depositadas no banco de

dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI), usando o BLAST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um total de 72 estirpes. Destas, 75% apresentaram crescimento intermediário a lento e alcalinizaram o pH do meio de cultura. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi realizado para 58 estirpes.

A identificação e o número de estirpes por gêneros foram: *Bradyrhizobium* (43), *Paenibacillus* (cinco), *Rhizobium* (cinco), *Bacillus* (duas) e uma em cada um dos gêneros *Brevibacillus*, *Inquillus* e *Sinorhizobium* (Tabela 1).

Dos nódulos analisados, 16% apresentaram mais de uma estirpe, com co-habitação de estirpes pertencentes a diferentes gêneros: nodulíferos (*Bradyrhizobium* e *Rhizobium*; *Sinorhizobium* e *Rhizobium*), endofíticos (*Brevibacillus* e *Paenibacillus*), nodulíferos e endofíticos (*Bradyrhizobium* e *Bacillus*; *Bradyrhizobium* e *Inquillus*; *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus*) e o mesmo gênero para nodulíferos (*Bradyrhizobium*) e endofíticos (*Paenibacillus*) (Tabela 1).

Nosso trabalho é o primeiro a identificar, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, estirpes de BFNNL, isoladas de nódulos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), no Brasil. Atualmente, a nível mundial, apenas três trabalhos realizaram a identificação genética de estirpes isoladas de feijão-fava, através do sequenciamento desse gene (Ormeño-Orrillo et al., 2006; López-López et al., 2013; Matsubara & Zúñiga-Dávila, 2015). *Bradyrhizobium* foi o único microssimbionte identificado nos trabalhos de Ormeño-Orrillo et al. (2006) e López-López et al. (2013). *Bradyrhizobium* foi o gênero de maior ocorrência (88%) no trabalho de Matsubara & Zúñiga-Dávila (2015), com as demais estirpes pertencentes ao gênero *Rhizobium*.

Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* são conhecidos como nodulíferos. Solos brasileiros apresentam alta diversidade de BFNNL, entretanto, o gênero *Bradyrhizobium*, destaca-se por sua ampla ocorrência como simbionte de espécies florestais e herbáceas nativas, como forrageiras, grãos e adubação verde (Moreira et al., 1993; Lima et al., 2009; Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013), além de apresentar alta estabilidade genética.

Os gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Inquillus* e *Paenibacillus* não são reconhecidos como nodulíferos. *Bacillus* e *Paenibacillus* são geralmente endofíticos de nódulos, entretanto, alguns trabalhos têm verificado nodulação para estes gêneros (Marra et al., 2012; Costa et al., 2013; Jaramillo et al.,



2013). Possivelmente, bactérias endofíticas de nódulos podem evoluir para bactérias simbióticas por meio da transferência horizontal de genes simbióticos (Li et al., 2008).

Bactérias endofíticas ao nódulo podem atuar como promotoras do crescimento vegetal, por meio da solubilização de fosfatos, produção de fitormônios, dentre outros processos (Marra et al., 2012; Costa et al., 2013).

CONCLUSÕES

Estirpes isoladas de feijão-fava apresentam alta diversidade genética, sendo identificados os gêneros nodulíferos conhecidos (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*), com maior ocorrência do gênero *Bradyrhizobium*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e ao projeto CRA RDP – 00136/10 FAPEMIG/PAPESP/FAPESPA/VALE S.A., pela concessão de bolsas de estudo e pesquisa.

REFERÊNCIAS

- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48:1275-1284, 2013.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S. A. *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143p.
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A. et al. 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.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=1612>>. Acesso em 06 jun. 2014.
- JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A. et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped in soils under agroforestry systems. *Scientia Agricola*, 70:397-404, 2013.
- LI, J. H.; WANG, E. T.; CHENA, W. F. et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:238-246, 2008.
- LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*, 319:127-145, 2009.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A.; NEGRETE-YANKELEVICH, S.; ROGEL, M. A. et al. Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Systematic and Applied Microbiology*, 36:33-38, 2013.
- MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA S. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil*, 357:289-307, 2012.
- MATSUBARA, M. & ZÚÑIGA-DÁVILA, D. Phenotypic and molecular differences among rhizobia that nodulate *Phaseolus lunatus* in the Supe valley in Peru. *Annals of Microbiology*, 2015.
- MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B. et al. Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16:135-146, 1993.
- NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H. V. et al. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology*, 82:477-484, 1997.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZÚÑIGA-DAVILA D. et al. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:253-262, 2006.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; TORRES, R.; MAYO, J. et al. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: VELÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. eds. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102:143-147, 2007.
- SANTOS, J. O.; ANTUNES, J. E. L.; ARAÚJO, A. S. F. et al. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. *Annals of Microbiology*, 61:437-444, 2011.



Tabela 1 – Características culturais e identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) cultivado em campo, na comunidade primavera em Santa Luz, Piauí. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

Estirpes	Planta (Nódulo)	TC/pH	Extensão (pb)	Similaridade das sequências no GenBank		
				Espécie	Similaridade (%)	Número de Acesso
UFLA 02-195	1 (1)	IAL	297	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114645.1
UFLA 02-196	1 (2*)	RAC	825	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KJ831227.2
UFLA 02-198	1 (2*)	RAC	515	<i>Sinorhizobium</i> sp.	99	FR872496.1
UFLA 02-199	1 (3)	IAL	737	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-200	1 (4)	IAL	505	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF933597.1
UFLA 02-201	1 (5*)	RN	632	<i>Inquilinus</i> sp.	99	FR872494.1
UFLA 02-202	1 (5*)	IAL	536	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-205	2 (3)	IAL	413	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-206	2 (4)	IAL	360	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF933597.1
UFLA 02-207	2 (5*)	RAC	604	<i>Rhizobium</i> sp.	100	HG518323.1
UFLA 02-208	2 (5*)	IAL	504	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113093.2
UFLA 02-209	2 (6)	IAL	839	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113095.2
UFLA 02-210	3 (1)	IAL	794	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-211	3 (2)	IAL	584	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF933597.1
UFLA 02-213	3 (3)	IAL	465	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF527973
UFLA 02-214	3 (4)	IAL	766	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF114634.1
UFLA 02-215	3 (5)	IAL	800	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF113077.2
UFLA 02-217	4 (1)	LAL	695	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JX514881.1
UFLA 02-218	4 (2)	LAL	526	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-220	4 (3)	IAL	508	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-221	4 (4)	LAL	310	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-222	4 (5)	IAL	367	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-225	5 (2)	RAC	417	<i>Bacillus</i> sp.	100	KJ733993.1
UFLA 02-229	5 (5*)	RAC	701	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KF638355.1
UFLA 02-230	5 (5*)	IAL	444	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-231	5 (6)	LAL	528	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-232	6 (1)	RAC	710	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KJ128395.1
UFLA 02-233	6 (2)	IAL	506	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-234	6 (3*)	RN	561	<i>Bacillus</i> sp.	100	KC236623.1
UFLA 02-235	6 (3*)	IAL	580	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KC414760.1
UFLA 02-236	6 (4)	IAL	395	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF527971.1
UFLA 02-237	6 (5)	LAL	313	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF933600.1
UFLA 02-239	7 (1*)	RAC	572	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KC294077.1
UFLA 02-240	7 (1*)	LAL	475	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-241	7 (3)	LAL	460	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-242	7 (4)	IAL	535	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF113094.2
UFLA 02-243	7 (5*)	RAC	923	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF479647.1
UFLA 02-244	7 (5*)	IAL	400	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF527975.1
UFLA 02-245	7 (6)	IAL	547	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-246	8 (2)	IAL	632	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KF933597.1
UFLA 02-247	8 (3*)	RAC	763	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KC294077.1
UFLA 02-248	8 (3*)	RAC	776	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KC294077.1
UFLA 02-250	8 (4*)	RAC	567	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KC294077.1
UFLA 02-251	8 (4*)	RAL	434	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	AB190075.1
UFLA 02-252	8 (5)	RAL	646	<i>Rhizobium</i> sp.	100	HG518323.1
UFLA 02-253	8 (6)	IAL	684	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-254	9 (1)	IAL	822	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF114634.1
UFLA 02-255	9 (2)	LAL	576	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-256	9 (3)	IAL	513	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF927049.1
UFLA 02-257	9 (4)	IAL	492	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-258	9 (5)	IAL	732	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KC677617.1
UFLA 02-259	9 (6)	LAL	416	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF527971.1
UFLA 02-260	10 (1*)	LAL	524	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF927051.1
UFLA 02-261	10 (1*)	IAL	557	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	JN085503.1
UFLA 02-262	10 (2)	IAL	512	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-263	10 (3)	IAL	394	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1
UFLA 02-264	10 (4)	LAL	418	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF527973.1
UFLA 02-265	10 (5)	IAL	506	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KF933597.1

*Números idênticos entre parênteses, referente a cada planta indicam estirpes isoladas do mesmo nódulo; TC/pH: tempo de crescimento e alteração do pH (RAC – rápido e ácido; RN - rápido e neutro; RAL – rápido e alcalino; IAL – intermediário e alcalino; LAL - lento e alcalino; pb: número de pares de base.