

Diversidade genética de rizóbios de feijão-caupi em Luvissoles do Sertão pernambucano

Aleksandro Ferreira da Silva¹; Valéria Borges da Silva²; Pablo Acácio dos Santos Souza³; Andressa Silva de Oliveira³, Ana Dolores Santiago de Freitas⁴; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁵

Resumo

Com este trabalho, objetivou-se avaliar a diversidade genética de rizóbios de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nativos de Luvissoles em municípios do Sertão pernambucano. As comunidades rizobianas foram acessadas utilizando-se a cultivar BRS Pujante como planta-isca em casa de vegetação. Após o isolamento e purificação, realizou-se a extração do DNA e amplificação dos fragmentos do gene simbiótico *nodC* de α e β -rizóbios. Para os isolados *nodC* positivo, amplificou-se o gene 16S rRNA para se proceder com as análises de restrição utilizando-se as enzimas: *HaeIII*, *MspI*, *Hin6I* e *Tru1I*. Os perfis de restrição do 16S rRNA dos 70 isolados *nodC* positivo, juntamente com as estirpes-referência, permitiram a formação de dois grandes grupos que separaram α e β -rizóbios. Nenhum dos 70 isolados apresentou 100% de similaridade com nenhuma das dez estirpes-referência utilizadas. Custódia e Serra Talhada foram os municípios com os maiores índices de diversidade e riqueza. As populações de rizóbios de feijão-caupi estabelecidas em Luvissoles do Sertão pernambucano apresentam perfis genéticos muito diverso.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, Semiárido, simbiose.

¹Engenheiro-agrônomo, doutorando em Ciência do Solo – UFRPE, bolsista Capes, Recife, PE.

²Graduada em Ciências Agrárias, doutoranda em Ciência do Solo – UFPB, Professora do Instituto Federal do Piauí-IFPI, Areia, PB.

³Graduando (a) em Ciências Biológicas – UFRPE, Recife, PE.

⁴Engenheira-agrônoma, D.Sc. e Tecnologias Energéticas Nucleares, professora do Departamento de Agronomia da UFRPE, Recife, PE.

⁵Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@cpatsa.embrapa.br.

Introdução

No Brasil, ao longo dos últimos anos, o feijão-caupi tem adquirido maior expressão econômica. Embora seja cultivado em todas as regiões, o Nordeste ainda detém a maior área plantada (Freire Filho, 2011). Seu cultivo tem sido praticado tanto em pequenos quanto em médios e grandes estabelecimentos agropecuários que, por consequência, utilizam diferentes aportes tecnológicos.

No Semiárido brasileiro, a maior produção tem sido por unidades de produção familiar. Nesta região, o feijão-caupi, de alto valor nutritivo (principalmente como fonte de proteína) e de ampla adaptabilidade às condições tropicais, tem grande importância socioeconômica, sendo responsável por fixar mão de obra e gerar emprego e renda.

Por estabelecer simbiose com rizóbios e apresentar ampla faixa hospedeira, o uso desta leguminosa no Semiárido brasileiro tem sido estratégico para a gestão da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em sistemas agrícolas como recurso sustentável.

Contribuições vêm sendo feitas no avanço do conhecimento da ecologia e diversidade de rizóbios em diferentes ecossistemas brasileiros. Com isso, novas espécies de rizóbios têm sido descritas a partir de solos do Brasil (Radl et al., 2014), indicando a importância da exploração deste recurso biológico, tanto para o melhor entendimento da biodiversidade como para a aplicação biotecnológica. Diante disso, a exploração de rizóbios de feijão-caupi em solos de ampla distribuição no Semiárido, como os Luvisolos, por exemplo, pode indicar novos *taxa* bacterianos com características peculiares de adaptação às condições edafoclimáticas da região.

Com este estudo, objetivou-se avaliar a diversidade genética de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de Luvisolos do Sertão pernambucano.

Material e Métodos

As comunidades rizobianas foram acessadas a partir de ensaio de planta-isca utilizando feijão-caupi (BRS Pujante) em casa de vegetação. Os substratos para o desenvolvimento das plantas foram amostras superficiais (0-20 cm) de Luvisolos de áreas de Caatinga densa de cinco municípios (Petrolina, Santa Maria da Boa Vista, São José do Egito, Custódia e Serra Talhada) do Sertão pernambucano. As plantas foram cultivadas por 50 dias, quando as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas e os nódulos dessecados. Cinco nódulos foram amostrados aleatoriamente de cada vaso para o isolamento.

A assepsia dos nódulos ocorreu por imersão em álcool etílico (96° GL) por 30 segundos e hipoclorito de sódio (2,5%) por 5 minutos, com dez lavagens sucessivas em água destilada estéril para posterior esmagamento em meio de cultura YMA. As placas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias bacterianas, que foram purificadas no mesmo.

O DNA molde utilizado para as amplificações foi extraído pelo método de lise alcalina das células, adaptado de Wang et al. (1993). Todos os isolados foram submetidos à amplificação de fragmentos do gene simbiótico *nodC*. Os pares de iniciadores utilizados foram: NodCforBurk e NodCrevBurk, para beta rizóbios (Elliott et al., 2007) e NodCfor540 e NodCrev1160 (Sarita et al., 2005), para alfa rizóbios. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (1,0%) a 100 V por 90 minutos.

Para todos os isolados *nodC* positivo, avaliou-se a diversidade genética utilizando-se a técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA). Para tal, amplificou-se o gene 16S com os iniciadores universais Y1 e Y3. As digestões ocorreram “overnight” a 37 °C utilizando-se as endonucleases *HaeIII*, *MspI*, *Hin6I* e *Tru1I*. Tanto para a amplificação dos genes, quanto para as análises de restrição, os géis foram visualizados em fotodocumentador com luz UV.

As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica), empregando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade. Os índices de diversidade foram obtidos utilizando-se o programa Past (Hammer et al., 2001).

Resultados e Discussão

Ao final do isolamento foram obtidas 84 bactérias. Após serem submetidas à amplificação dos fragmentos do gene simbiótico *nodC*, 70 foram positivas para a amplificação de um dos fragmentos. Os perfis de restrição do 16S rRNA dos 70 isolados rizobianos, com as estirpes-referência, permitiram a formação de dois grandes grupos com 38,37% de similaridade que, de acordo com a distribuição das estirpes de referência, consistiu na separação das subclasses α e β -Proteobacteria (Figura 1).

O grupo 1, formado pelos α -rizóbios, foi o menor, agrupando 19 isolados novos de feijão-caupi. Junto a esses, ficaram agrupadas as estirpes-referência. Neste grupo, 95,8 % dos isolados são nativos dos Luvissolos de Custódia e Serra Talhada. No grupo 2, os 51 novos isolados agruparam-se aos cinco β -rizóbios de referência. Esse grupo é formado por isolados de todos os locais de coleta.

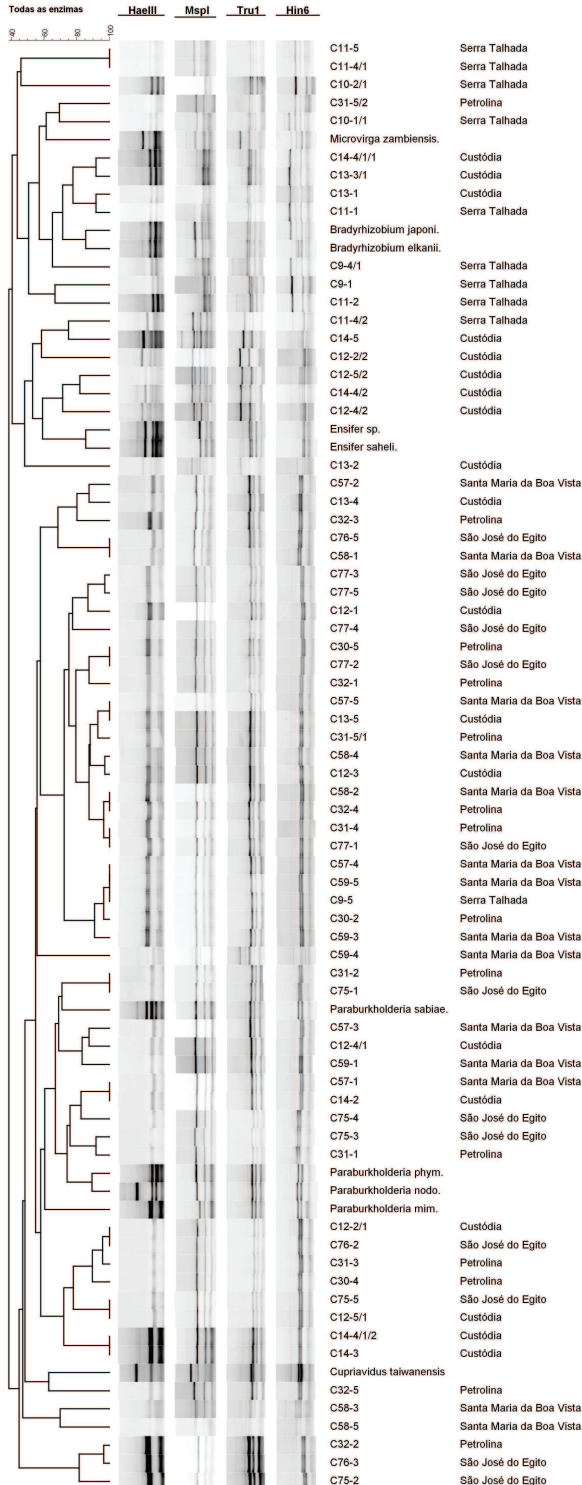


Figura 1. Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de restrição do gene 16S rRNA de novos isolados de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e de estirpes-referência, utilizando-se as endonucleases *MspI*, *HaeIII*, *Hin6I* e *TruI*.

Grande variabilidade genética foi verificada para todos os isolados rizobianos avaliados. Além disso, nenhum dos 70 isolados apresentou 100% de similaridade com nenhuma das dez estirpes-referência utilizadas. Tais resultados podem sugerir a presença de rizóbios ainda não descritos. Estudando a diversidade de rizóbios nativos de solos do Vale do São Francisco e oriundos de nódulos de feijão-caupi, Leite et al. (2009), utilizando a técnica de ARDRA, também verificaram grande variabilidade genética dos isolados, porém, com prevalência de α -rizóbios, divergindo dos resultados deste estudo.

Índices de diversidade foram calculados para cada local de coleta considerando-se a formação de grupos a 70% de similaridade. O índice de diversidade de Shannon-Weaver e riqueza de Margalef foram maiores para os Luvisolos de Custódia e Serra Talhada.

Os valores de equitabilidade encontrados neste estudo sugerem uniformidade na distribuição dos grupos rizobianos, não havendo, portanto, dominância de quaisquer grupo (Tabela 1). Embora todos os municípios estejam localizados no Sertão pernambucano, as maiores médias de precipitação pluviométrica foram constatadas em Custódia e Serra Talhada. Além disso, os Luvisolos desses dois municípios apresentaram os maiores teores de fósforo (P). Isso, em parte, pode justificar a maior diversidade e riqueza de rizóbios nestes locais.

Tabela 1. Diversidade de Shannon-Weaver, riqueza de Margalef e equitabilidade de Pielou de rizóbios de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] nativos de Luvisolos do Sertão de Pernambuco.

	Custódia	Petrolina	Santa Maria da Boa Vista	São José do Egito	Serra Talhada
Shannon (H')	2,13	1,77	1,77	1,62	2,16
Margalef	3,05	2,65	2,65	1,95	3,47
Pielou	0,92	0,85	0,85	0,90	0,98

Conclusão

Populações de rizóbios de feijão-caupi estabelecidas em Luvisolos do Sertão pernambucano apresentam perfis genéticos muito diverso.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de doutorado, à Embrapa (03.16.05.016.00.00) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W. M.; BONTEMPS, C.; CHOU, J. H.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1403-1411, 2007.

FREIRE FILHO, F. R. (Ed.). **Feijão caupi**: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST**: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

RADL, V.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 725-730, 2014.

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 1-11, 2005.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 4153-4154, 1993.