

# Caracterização de Bactérias Isoladas de Nódulos de Feijão-caupi Cultivado em Vertissolo em Juazeiro, BA

Characterization of Bacteria Isolated from Root Nodules of Cowpea Grown in Vertissol in Juazeiro, BA

---

*Rejane de Carvalho Nascimento<sup>1</sup>; Helanne Silva Santos Barden<sup>2</sup>; Tailane Ribeiro do Nascimento<sup>1</sup>; Tainá dos Santos Dourado Ferreira<sup>3</sup>; Rafaela Simão Abrahão Nóbrega<sup>4</sup>; Carlos Alberto Tuão Gava<sup>5</sup>; Lindete Miria Vieira Martins<sup>6</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>7</sup>*

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotipicamente bactérias de nódulos de duas variedades de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivado em um Vertissolo. Duas cultivares de feijão-caupi (BRS Pujante e BRS Acauã) foram plantadas no Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro, BA. Foram selecionados 20 nódulos de cada parcela para o isolamento. Os nódulos foram

---

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Bióloga, aluna do curso de pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, PI.

<sup>3</sup>Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista Pibiti-CNPq da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>4</sup>Engenheira-agrônoma, D. Sc. em Ciência do Solo, professora ajunta da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, BA.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, D. Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>6</sup>Engenheira-agrônoma, D. Sc. em Ciência do Solo, professora ajunta da Universidade do Estado da Bahia (Uneb), Juazeiro, BA.

<sup>7</sup>Biólogo, D. Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

desinfestados superficialmente e macerados em placas de Petri contendo meio YMA. No mesmo meio, as bactérias foram purificadas. Para a autenticação dos isolados, foram realizadas as amplificações dos genes *nifH* e *nodC* em uma reação duplex PCR e os isolados com amplificação positiva foram caracterizados culturalmente. De um total de 92 isolados obtidos, 49 apresentaram a amplificação para, pelo menos, um dos genes estudados. Todos os isolados apresentaram em torno de 50% de similaridade, de acordo com suas características culturais. A maioria dos isolados foram de crescimento rápido e apresentaram a capacidade de acidificar o meio de cultura. Os isolados de feijão-caupi apresentaram baixa similaridade com as estirpes de referência utilizadas.

**Palavras-chave:** rizóbio, fixação biológica de nitrogênio, inoculante, diversidade.

## Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] se destaca como cultura adaptada e de importância socioeconômica para pequenos e médios agricultores do Semiárido (MARINHO et al., 2014), sendo a principal fonte de proteína para grande parte da população sertaneja. O desenvolvimento de tecnologias de baixo custo pode auxiliar no aumento da produtividade desta leguminosa, colaborando, assim, para maior geração de renda no meio rural do Nordeste.

Dentre as tecnologias de baixo custo que já existem no mercado, a inoculação de sementes de leguminosas com estirpes de rizóbio pode ser considerada uma das mais promissoras, uma vez que as estirpes selecionadas podem reduzir os custos de produção e aumentar a produtividade sem impactos ambientais. Estudos de prospecção por bactérias fixadoras de nitrogênio têm obtido isolados cada vez mais promissores, inclusive oriundos de áreas semiáridas (MARINHO et al., 2014; MARTINS et al., 2003).

Estudos pioneiros conduzidos no Semiárido por Martins et al. (2003) subsidiaram a recomendação de uma das estirpes atualmente utilizada na produção de inoculantes comerciais no Brasil, demonstrando o potencial biotecnológico dos rizóbios isolados na região. Além do potencial para a geração de produtos biotecnológicos, a constante seleção de novos isolados se faz necessária para o melhor entendimento da diversidade e taxonomia de rizóbios.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotipicamente isolados de rizóbio oriundos de nódulos de duas variedades de feijão-caupi por meio da amplificação dos genes *nifH* e, ou *nodC* como estratégia de autenticação.

## Material e Métodos

Para a obtenção dos nódulos para o isolamento, foi instalado um experimento no Campo Experimental de Mandacaru (CEM) (09°24'S 40°26'W), Juazeiro, BA, pertencente à Embrapa Semiárido. Foram utilizadas as variedades BRS Pujante e BRS Acauã como plantas-isca. Aos 45 dias após a emergência das plantas, as raízes foram separadas das partes aéreas e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. As raízes foram lavadas e os nódulos foram destacados manualmente.

Para o isolamento das bactérias, 20 nódulos de cada parcela foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio (VINCENT, 1970) e macerados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com vermelho congo. As placas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento de colônias. As bactérias crescidas foram inoculadas sucessivas vezes em placas com meio YMA contendo azul de bromotimol e incubadas até a obtenção de colônias puras.

Todos os isolados obtidos foram submetidos à reação de Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, como estratégia de autenticação das bactérias. Para a extração do DNA genômico foi adotado o protocolo com o uso de choque térmico e as reações de PCR foram realizadas de acordo com Fernandes Júnior et al. (2013). Em todas as extrações de DNA e reações de PCR, a estirpe BR 322 de *Rhizobium tropici* foi utilizada como controle. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (p/v). Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em sistema de fotodocumentação com luz UV.

As bactérias consideradas positivas para a amplificação dos fragmentos dos genes *nifH* e/ou ou *nodC* foram caracterizadas culturalmente de acordo com o seu tempo de crescimento (rápidas, intermediárias ou lentas); reação de pH do meio (reação ácida, sem reação ou reação alcalina); tamanho da colônia (menor que 1 mm, entre 1 mm e 2 mm ou maior que 2 mm); cor da colônia; quantidade de muco (pouco ou muito muco) e tipo de muco (viscoso ou butírico).

Como estirpes de referência, foram utilizadas as estirpes BR 322 de *Rhizobium tropici* e BR 5609 de *Bradyrhizobium japonicum*. Os dados foram transformados em uma planilha binária para a construção de um dendrograma de similaridade por agrupamento com base no índice de Dice e no algoritmo UPGMA, utilizando o programa PaSt (HAMMER et al., 2001). Os grupos com 100% de similaridade tiveram suas características, bem como o número de isolados de cada grupo, descritos em uma tabela para melhor visualização.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 92 isolados bacterianos após os procedimentos de isolamento e purificação. Destes isolados, 49 apresentaram amplificação positiva para, pelo menos, um dos genes-alvo na reação de duplex-PCR. O agrupamento de acordo com suas características culturais formou 23 grupos, dos quais 11 são grupos raros, ou seja, com apenas um isolado (Tabela 1).

O grupo 2 apresentou maior quantidade de isolados e também englobou a estirpe de referência BR 5609 de *Bradyrhizobium japonicum*. A estirpe de referência BR 322 de *Rhizobium tropici* foi alocada no grupo 3 com outros quatro isolados. Analisando as características fenotípicas das bactérias, é possível observar que 66% dos isolados apresentaram crescimento rápido. Com relação à alteração do pH do meio, 35% não o alteraram, enquanto 50% foram capazes de acidificar o meio de cultura. No que se refere ao tamanho e forma da colônia, 46% apresentaram dimensão entre 1 mm a 2 mm e 72% formaram colônias circulares e a cor predominante das colônias foi a branca (73%).

Estudando a diversidade fenotípica de rizóbios do Semiárido de Pernambuco, Silva et al. (2007) também verificaram a predominância de bactérias de crescimento rápido e com cores e demais características culturais similares às observadas neste trabalho. Leite et al. (2009) também observaram baixa similaridade entre as estirpes de referência dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* com os rizóbios de feijão-caupi isolados no Submédio do Vale do Rio São Francisco.

**Tabela 1.** Caracterização fenotípica dos grupos de bactérias *nifH* e/ou *nodC* positivas isolados de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] (BRS Pujante e BRS Acauã) cultivado em Vertissolo em Juazeiro, BA.

Grupos/ Nº de isolados	Características dos grupos					
	TC	pH	TmC	CC	QM	TM
Grupo 1 (2)	L	N	P	Am	MM	Bu
Grupo 2 (8)	L	Alc	> 2 mm	Br	PM	Bu
Grupo 3 (4)	L	Alc	> 2 mm	Br	PM	Bu
Grupo 4 (1)	L	N	> 2 mm	Br	MM	Bu
Grupo 5 (4)	L	N	P	Br	MM	Bu
Grupo 6 (1)	L	N	> 2 mm	Br	MM	V
Grupo 7 (3)	L	Alc	> 2 mm	Br	MM	V
Grupo 8 (1)	L	N	1 a 2 mm	Br	PM	V
Grupo 9 (2)	L	N	1 a 2 mm	Br	MM	V
Grupo 10 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Br	MM	V
Grupo 11 (1)	L	N	1 a 2 mm	Br	MM	V
Grupo 12 (2)	L	N	P	Br	MM	V
Grupo 13 (2)	L	N	1 a 2mm	Br	MM	V
Grupo 14 (1)	L	N	> 2 mm	Br	MM	V
Grupo 15 (4)	R	Ác	1 a 2 mm	Am	MM	V
Grupo 16 (1)	R	Alc	1 a 2 mm	Am	MM	V
Grupo 17 (3)	R	Ác	1 a 2mm	Am	MM	V
Grupo 18 (2)	R	Ác	1 a 2mm	Br	MM	V
Grupo 19 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Br	MM	V
Grupo 20 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Am	PM	V
Grupo 21 (1)	L	N	P	Br	MM	V
Grupo 22 (2)	L	N	1 a 2mm	Am	MM	V
Grupo 23 (1)	L	N	1 a 2mm	Br	MM	V

TC - tempo de crescimento (R- rápido, L- lento); pH (Ác.- ácido, N- neutro, Alc.- alcalino); TmC - tamanho da colônia (P - puntiforme); CC - cor da colônia (Br - branca, Am - amarela); QM - quantidade de muco (PM - pouco muco, MM - muito muco); TM - tipo de muco (V - viscoso, Bu - butirico).

## Conclusão

Há elevada diversidade fenotípica entre os isolados de rizóbio avaliados neste estudo e baixa similaridade dos mesmos com as estirpes de referência.

## Referências

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 H e C em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98607/1/COT158.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2014.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, 2005. 519 p.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, D. PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, Ottawa, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001. Disponível em: <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)>. Acesso em: 20 jul. 2014.

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**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 1.215-1.226, 2009.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiárid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 5 p. 395-402, 2014.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Switzerland, v. 38, p. 333-339, 2003.

SILVA, N. S.; SILVA, L. E. F.; FIGUEIREDO, F. G. C.; SILVA, M. L. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.

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