

Amplificação de Fragmentos de Genes Simbióticos e Características Fenotípicas de Bactérias Isoladas de Nódulos de Angico Oriundas de Solos do Agreste Pernambucano

Genes Symbiotic Fragments of Amplification and Characteristics of Bacteria Isolated from Phenotypic from Angico Nodules Agreste of Soil Pernambucano

Dalila Ribeiro Rodrigues¹; Aleksandro Ferreira da Silva²; Katherine Gomes Oliveira³; Tailane Ribeiro do Nascimento³; Rejane de Carvalho Nascimento³; Maria Idaline Pessoa Cavalcante¹; Indra Elena Costa Escobar⁴; Ana Dolores Santiago de Freitas⁵; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁶

Abstract

The use of inoculated legumes with nitrogen fixing bacteria is a strategy to improve land reclamation practices. In addition the use of these bacteria can help the establishment of the plants in the field at reduced cost and low environmental impact. The selection and evaluation of bacterial diversity are important, but these kind of results are scarce in the Brazilian Semi-arid. The aim of this study was to select bacteria from angico nodules by means of its phenotypical characteristics and amplification of symbiotic genes by PCR (Polymerase Chain Reaction). From the 32 bacterial isolates that were evaluated, all of them amplified positively the *nifH* gene and 24 amplified both the *nifH* and *nodC* genes. All bacteria presented fast growth and acidified the culture medium, and diverged in other phenotypical features. These results indicate variability in the amplification profiles and phenotypical features evaluated.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation, Rhizobia, Land Reclamation, Caatinga.

Introdução

O Agreste pernambucano é uma área de transição entre a Zona da Mata e o Sertão, apresentando desde enclaves de Mata Atlântica, até formações vegetais características de Caatinga (MILET-PINHEIRO;

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

²Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

³Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

⁴Bolsista PNPd, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE.

⁵Professora, UFRPE, Recife, PE.

⁶Pesquisador, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

SCHLINDWEIN, 2008). Seus ecossistemas encontram-se bastante alterados devido à atividade antrópica na substituição de espécies vegetais nativas por espécies cultivadas, pastagens e construções civis.

O uso intensivo das florestas para produção de lenha, uso agrícola e pecuária são as principais causas de desmatamento, que atingem aproximadamente 46% das áreas nativas. Essas ações têm como consequência pequenas áreas abandonadas para regeneração espontânea, intercaladas a poucas áreas preservadas, resultando em perda da biodiversidade nesses ambientes (SAMPAIO, 1995).

Além de aplicações agronômicas, medicinais, industriais, diversas leguminosas podem ser utilizadas como espécies potenciais para o sistema de regeneração de áreas degradadas. O potencial das leguminosas para a utilização neste sistema é relevante por causa da associação simbiótica de diversas espécies com bactérias nomeadas fixadoras de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, a seleção de micro-organismos para a inoculação de espécies arbóreas nativas é importante (MARTINS et al., 2015). Na caracterização de isolados de rizóbio, etapas preliminares de avaliação podem garantir a seleção de micro-organismos alvos que apresentem potencial para estudos subsequentes mais laboriosos e, ou dispendiosos. Moreira e Siqueira (2006) descrevem que a capacidade de acidificar o meio de cultura pode estar relacionada com o pH do solo onde os nódulos destas bactérias foram coletados, que por motivo de adaptação possuem este desempenho. Estudos complementares para a caracterização dos isolados estão sendo conduzidos para avaliar seu potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em angico (*Anadenanthera colubrina*).

Dentre as metodologias preliminares aplicadas na seleção de isolados de rizóbio em ações de isolamento e estruturação de coleções, a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* é uma das que apresentam baixo custo e possibilitam a seleção de isolados potencialmente nodulantes, excluindo possíveis bactérias contaminantes isoladas dos nódulos (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). O presente estudo teve como objetivo a caracterização fenotípica cultural e a amplificação dos genes *nifH* e *nodC* de bactérias isoladas de nódulos de angico cultivadas em solos de áreas nativas em e em regeneração no Agreste pernambucano.

Material e Métodos

As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas de plantas de angico e cultivadas em vasos com amostras superficiais de solos, provenientes de áreas preservadas e em regeneração do Agreste pernambucano, nos municípios de Caruaru e Garanhuns. 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. Após a coleta, as raízes foram lavadas e seus nódulos destacados.

O isolamento das bactérias contidas no interior dos nódulos foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. Os nódulos foram desinfestados superficialmente, conforme citado anteriormente e, em seguida, foram esmagados com uma pinça na placa de Petri contendo meio YMA com

vermelho congo e 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.

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 a realização do Duplex-PCR do *nifH* e *nodC* (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). As amplificações foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido por Fernandes Júnior et al. (2013), utilizando os iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PoIR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (POLY et al., 2001) para amplificação de um fragmento do gene *nifH*, e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para amplificação de um fragmento do gene *nodC* (LAGUERRE et al., 2001). Em 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 foi feita em transluminador sob luz UV.

As bactérias com amplificação positiva para um dos fragmentos, pelo menos, foram caracterizadas fenotipicamente de acordo com o seu tempo de crescimento, reação de pH do meio, tamanho, cor e aparência da colônia. Os dados obtidos foram transformados em uma planilha binária para elaboração do dendrograma de similaridade por agrupamento com base no índice de Bray-Curtis e no algoritmo UPGMA, utilizando o programa PaSt (HAMMER et al., 2001).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 32 isolados bacterianos e todos foram positivos para a amplificação do fragmento do gene *nifH* e oito isolados amplificaram simultaneamente fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*. O agrupamento dos isolados no dendrograma de similaridade, de acordo com suas características culturais fenotípicas (Figura 1) e de amplificação, gerou quatro grupos, sendo os grupos 1 e 2 os que apresentaram maior quantidade de isolados.

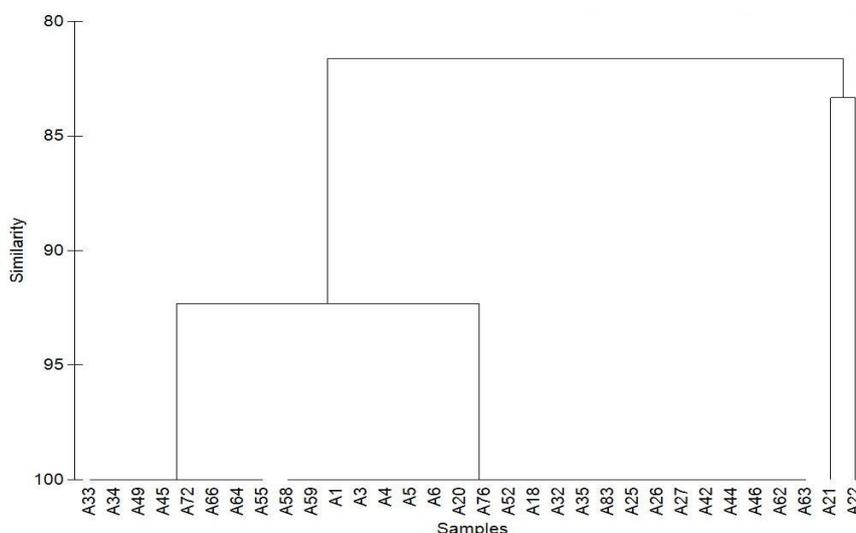


Figura 1. Dendrograma de similaridade a partir da caracterização fenotípica padrão de amplificação dos genes simbióticos dos isolados de Angico utilizando o algoritmo UPGMA e índice de similaridade Bray-Curtis.

Pela análise dos dados obtidos na caracterização fenotípica, todos os isolados apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio. Apenas um isolado teve o crescimento maior que 2 cm, um isolado apresentou colônias menores que 1 cm. Trinta isolados apresentaram colônias com tamanhos entre 1 e 2 cm. Todos os isolados apresentaram colônias circulares com aparência heterogênea (Tabela 1).

Tabela 1. Características fenotípicas e de amplificação dos cinco grupos de bactérias isoladas de nódulos de angico.

Grupos (n° de isolados)	Características fenotípicas e padrão de amplificação dos genes simbióticos					
	AMP	TC	pH	TmC	FC	AC
Grupo 1 (08)	<i>nifH + nodC</i>	R	Ácido	1-2	C	HET
Grupo 2 (22)	<i>nifH</i>	R	Ácido	1-2	C	HET
Grupo 3 (01)	<i>nifH</i>	R	Ácido	<1	C	HET
Grupo 4 (01)	<i>nifH</i>	R	Ácido	>2	C	HET

AMP – amplificação de fragmentos dos genes *nifH*, *nodC*; TC - tempo de crescimento (R - rápido); pH; TmC - tamanho da colônia; FC - forma da colônia (C - circular); AC- aparência da colônia (Het - heterogênea).

Estudos recentes realizados com isolados rizobianos de solos da região Nordeste têm indicado a predominância de bactérias que acidificam o meio de cultura e apresentam crescimento rápido (LYRA et al., 2013; TEXEIRA et al., 2010).

Dentre os isolados, poucos amplificaram o fragmento *nodC*, sugerindo, em hipótese, a presença de β -Rizóbios entre as estirpes estudadas, sendo que testes posteriores serão realizados para atestá-la. Estudos com sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), realizados por Martins et al. (2015), confirmaram que espécies do gênero *Mimosa* têm preferência em nodular com estirpes de β -rizóbios, principalmente do gênero *Burkholderia*.

Conclusões

Dentre as bactérias consideradas *nifH* e/ou *nodC* positivas, foram obtidos quatro grupos com 100% de similaridade.

Isolados de nódulos de angico de solos do Agreste pernambucano apresentam variabilidade em suas características fenotípicas e nos padrões de amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*.

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 *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.

LYRA, M. C. C. P.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. A.; SANTOS, C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 12, p. 2147-2156, 2013.

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**, Berlin, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015.

MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Comunidade de abelhas (*Hymenoptera, Apoidea*) e plantas em uma área do agreste pernambucano, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 625-636, 2008.

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

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R.; Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 3, p. 95-103, 2001.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Ed.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 35-63.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJAMEC, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 201-208, 2010.

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