

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

Amplification of Symbiotic Gene Fragments and Characterization of Bacteria Isolated from Angico Nodules from Soils Pernambuco Sertão Regions

Katherine Gomes Oliveira¹; Aleksandro Ferreira da Silva²; Dalila Ribeiro Rodrigues³; Tailane Ribeiro do Nascimento¹; Rejane de Carvalho Nascimento¹; Maria Idaline Pessoa Cavalcante³; Indra Elena Costa Escobar⁴; Ana Dolores Santiago de Freitas⁵; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁶

Abstract

This study aimed to isolate and characterize bacteria from angico (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan) root nodules grown in soils from a mature Caatinga and regeneration areas from the municipalities of Serra Talhada and Petrolina, both in Pernambuco state. The plants were grown in a trap-host plant experiment in green house conditions for four months. The plants received water as necessary and at harvest, the nodules were superficially disinfected with sodium hypochlorite and macerated in Petri dishes containing YMA with congo red. In the same medium, the bacteria were purified after several inoculations. For authentication of the isolates regarding the amplifications of *nifH* and *nodC* genes in a duplex PCR were evaluated. The isolates with positive amplifications were characterized culturally. Among the 36 isolates obtained, all of them amplified at least one symbiotic gene at the duplex PCR reactions. The characterization of the isolates clustered the bacteria on eight different groups of which two had a single isolate.

Keywords: diversity, inoculant, the isolated authentication.

Introdução

O angico (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan) possui crescimento rápido e pode ser utilizado para fortalecer a criação de abelhas em áreas de reflorestamento e também em áreas urbanas. Sua casca é rica e tanino e é utilizada em curtumes. A resina é utilizada em aplicações medicinais como anti-inflamatório, cicatrizante e no tratamento de problemas respiratório (SANTANA et al., 2008).

¹Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

²Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE. ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB. ⁴Bolsista PNPD, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE.

⁵Professora da UFRPE, Recife, PE.

⁶Biólogo, D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

Os ecossistemas da Caatinga encontram-se bastante alterados em decorrência de atividades antrópicas na substituição de espécies vegetais nativas por pastagens e para a agricultura de subsistência. As queimadas e o desmatamento são práticas muito comuns no preparo da terra, prejudicando a manutenção das populações da fauna silvestre, micro e macrofauna, microbiota, qualidade da água e do solo, além de atingir diretamente o equilíbrio do clima no planeta.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural realizado por bactérias denominadas bactérias diazotróficas, que são bactérias que podem se associar às plantas e, a partir do processo de fixação biológica, fornecer parcial ou totalmente o nitrogênio (N) necessário para o crescimento do hospedeiro. Dentre as associações entre bactérias diazotróficas e espécies vegetais, a melhor estudada e caracterizada é a simbiose rizóbio-leguminosa, onde há a formação de nódulos radiculares e/ou caulinares como estruturas anatômica e fisiologicamente especializadas para maximizar a FBN (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

O objetivo do trabalho foi isolar e amplificar os genes *nifH* e *nodC* e caracterizar bactérias de nódulos de angico plantados em solo de áreas de Caatinga madura e Caatinga em processo de regeneração em Pernambuco.

Material e Métodos

Para a obtenção dos nódulos para o isolamento, sementes de angico foram plantadas e cultivadas por um período de 4 meses em casa de vegetação, em solo de áreas de Caatinga em regeneração e preservada nos municípios de Serra Talhada e Petrolina.

Após 120 dias do plantio, as plantas foram coletadas e 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, até 20 nódulos de cada planta 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 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 feitas de acordo com o descrito por Fernandes Júnior et al. (2013). Em todas as extrações de DNA e reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) as estirpes BR 3299 (*Microvirga vignae*) e 3407 (*Burkholderia sabiae*) foram utilizadas como controle positivo. Os produtos das PCR's 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 *nodC* foram caracterizadas culturalmente. De acordo com a alteração do pH, tempo de crescimento, cor da colônia e tipo e produção de muco.

Os dados foram transformados em uma planilha binária para a elaboração de um dendrograma de similaridade por agrupamento com base no índice de Bray-Curtis e no algoritmo UPGMA, utilizando o

programa PaSt (HAMMER et al., 2001). A partir dos grupos formados, elaborou-se uma tabela com as características que diferem cada grupo.

Resultados e Discussão

Dentre os 36 isolados obtidos, todos apresentaram amplificação positiva para, pelo menos, um dos genes-alvo na reação de duplex-PCR. O agrupamento dos isolados no dendrograma de similaridade, de acordo com suas características culturais, formou oito grupos (Figura 1), sendo os grupos 6, 7 e 8 os que apresentaram os maiores números de isolados (Tabela 1).

Todos os isolados avaliados apresentaram amplificação para o gene *nifH* e 38% apresentaram amplificação também para o gene *nodC*. Analisando-se as características fenotípicas, foi possível observar que 47% das bactérias cresceram entre 1 mm e 2 mm e que apenas 20% obtiveram colônias menores que 1 mm, sendo 33% maior que 2 mm (Tabela1).

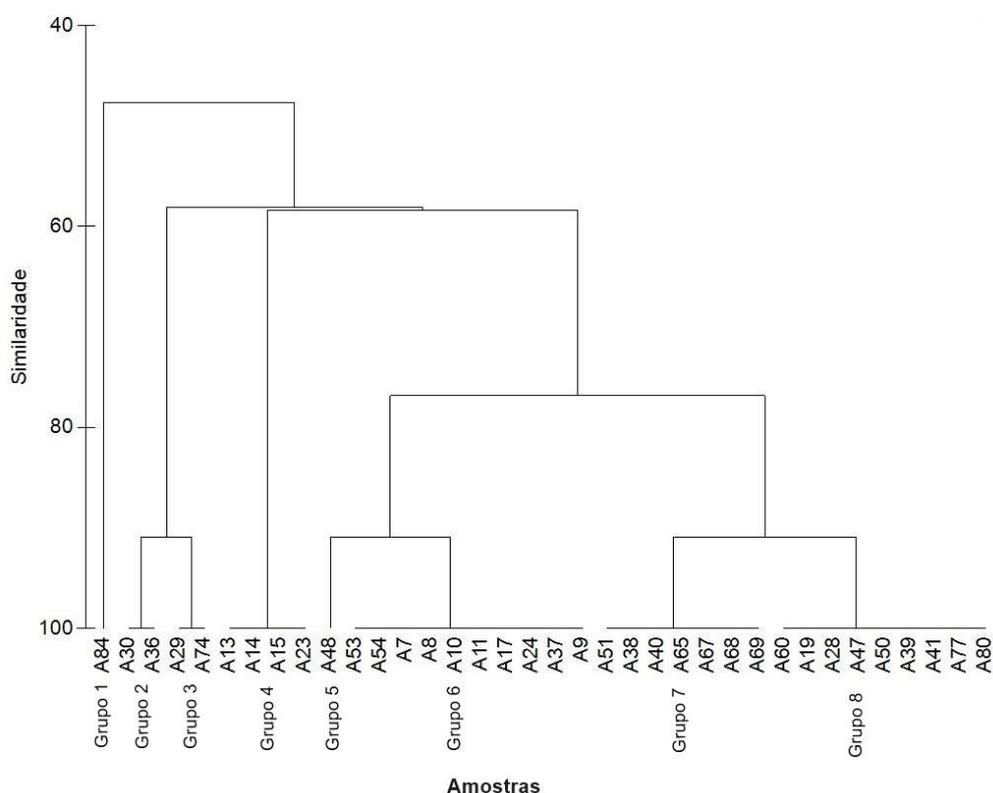


Figura 1. Dendrograma de similaridade a partir da caracterização fenotípica padrão de amplificação dos genes simbióticos dos isolados de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan) utilizando-se o algoritmo UPGMA e índice de similaridade Bray-Curtis.

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido e 97% foram capazes de acidificar o meio. Em estudo realizado por Meneses (2013), foi possível observar que a maior parte das bactérias isoladas de nódulos de angico apresentou crescimento rápido e foi capaz de acidificar o meio. Para Barnett e Catt, (1991), as características e distribuição de bactérias isoladas dos nódulos de leguminosas arbóreas são influenciados pela localização geográfica. Esses autores observaram que os isolados de crescimento rápido foram obtidos principalmente em zonas áridas.

Tabela 1. Características fenotípicas e de amplificação dos cinco grupos de bactérias isoladas de nódulos de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan).

Grupos/ Nº de isolados	Características dos grupos					
	AMP	TC	pH	TmC	FC	AC
Grupo 1 (1)	<i>nifH</i>	R	N	1-2	I	Het
Grupo 2 (2)	<i>nifH/nodC</i>	R	Ác	<1	I	Het
Grupo 3 (2)	<i>nifH</i>	R	Ác	<1	I	Het
Grupo 4 (4)	<i>nifH</i>	R	Ác	<1	C	Hom
Grupo 5 (1)	<i>nifH/nodC</i>	R	Ác	>2	C	Het
Grupo 6 (10)	<i>nifH</i>	R	Ác	>2	C	Het
Grupo 7 (7)	<i>nifH/nodC</i>	R	Ác	1-2	C	Het
Grupo 8 (9)	<i>nifH</i>	R	Ác	1-2	C	Het

AMP= amplificação do gene (*NifH*, *NodC*); TC= tempo de crescimento (R- rápido, L- lento); pH (Ác.- ácido, N- neutro, Alc.- alcalino); TmC= tamanho da colônia; FC- forma da colônia (C- circular, I- irregular); AC= aparência da colônia (Hom- homogênea, Het- heterogênea).

Conclusão

Isolados de rizóbio de angico em solos da Caatinga em diferentes estágios de regeneração nos municípios de Serra Talhada e Petrolina apresentam variabilidade em suas características fenotípicas e de padrões de amplificação dos genes estudados.

Referências

- BARNET, Y. M.; CATT, P. C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Accacia* spp, **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 135, p. 109-120,1991.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).
- 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. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**. Bloomington, v. 4, n.1, p. 9, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2014.
- MENEZES, K.A.S. **Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas cultivadas em solos do Semiárido**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, UNEB, Juazeiro.
- SANTANA, D. L.; PREZA, D. L. C.; ASSIS, J. G. A.; GUEDES, M. L. S. Plantas com propriedades terapêuticas utilizadas na comunidade de Campos, Amélia Rodrigues, Bahia, Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 3, p. 218-230, 2008.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).