



## Variabilidade genética de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Enterobacter* isoladas de nódulos de amendoim cultivados em solos do Semiárido<sup>(1)</sup>.

**Paulo Ivan Fernandes<sup>(2)</sup>; Indra Elena Costa Escobar<sup>(3)</sup>; Jussara Barboza de Alencar Cunha<sup>(4)</sup>; Tailane Ribeiro do Nascimento<sup>(5)</sup>; Rejane de Carvalho Nascimento<sup>(6)</sup>; Lindete Míria Vieira Martins**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq, Facepe e Embrapa

<sup>(2)</sup> Pesquisador, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Semiárido. paulo.ivan@embrapa.br. <sup>(3)</sup> Bolsista do PNPD no Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco. <sup>(4)</sup> Aluna do Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada. Universidade do Estado da Bahia. <sup>(5,6)</sup> Estudante de Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. <sup>(6)</sup> Professora Adjunta na Universidade do Estado da Bahia.

**RESUMO:** O estudo da biodiversidade de bactérias isoladas de nódulos envolve a busca por genótipos eficientes na FBN, visando um menor custo de produção e alta produtividade para os agrossistemas. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar genotipicamente bactérias isoladas de nódulos de amendoim cultivados em solos do semiárido nordestino. Foram isoladas 14 bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Enterobacter* de nódulos de amendoim. A análise da diversidade genética entre os isolados foi realizada por meio da técnica BOX-PCR. Os dados de similaridade com base na análise polifásica obtido pelo Coeficiente de Dice variaram entre 10% a 90% indicando alta diversidade genética entre os isolados analisados. Os isolados de *Rhizobium* e *Enterobacter* obtidos de nódulos de amendoim apresentam elevada variabilidade genética e podem ser bactérias com o potencial para promoção de crescimento em amendoim.

**Termos de indexação:** amendoim, Box-PCR, rizobio

### INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) desempenha importante papel socioeconômico para o Nordeste. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o Brasil possui 90 mil hectares de plantação de amendoim, com uma produção média de 326 mil toneladas em 2013 (CONAB, 2014). A busca por práticas que aumentem a produtividade na agricultura sem causar impactos ambientais, dentre as estratégias disponíveis, a substituição de adubos nitrogenados pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizado por bactérias diazotróficas se tornou uma alternativa promissora no suprimento de N para os agroecossistemas, oferecendo um baixo custo de produção e impacto ambiental reduzido. Estudos com bactérias nativas

isoladas de nódulos de amendoim têm mostrado que essas bactérias proporcionam boa nodulação, aumento no N total acumulado e aumento no rendimento de matéria seca da parte aérea em plantas de amendoim (Santos et al, 2005; Hoffman et al, 2007). O estudo da biodiversidade de bactérias isoladas de nódulos envolve a busca por genótipos eficientes na FBN, visando um menor custo de produção e alta produtividade. Técnicas de caracterização genotípicas vêm sendo empregadas nos estudos de população de bactérias que nodulam leguminosas, pois proporcionam a identificação e classificação dos isolados de forma mais rápida e eficiente (Santos, 2001). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar genotipicamente bactérias isoladas de nódulos de amendoim cultivados em solos do semiárido nordestino.

### MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares BR1 e a *Top line* LViPE-06 foram utilizadas como plantas-isca. Aos 40 dias após a emergência (DAE), as plantas foram coletadas e raízes lavadas em água corrente, 10 nódulos de cada planta foram selecionados. O isolamento das bactérias foi realizado nos nódulos frescos. Os nódulos foram desinfestados superficialmente e macerados com o auxílio de uma pinça flambada e estriados com alça de platina em placas de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970). Após a obtenção dos isolados puros foi realizada a extração do DNA para a amplificação do gene 16S do rRNA (Suzuki & Giovannoni, 1996). As sequências obtidas foram comparadas, por meio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), com sequências depositadas no National Centre for Biotechnology Information GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificação de sequências correlatas. Para o Box-PCR foi utilizado o primer BOX A1R (Invitrogen TM), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA



cromossômico, em geral, no espaço intergênico. Para análise da diversidade, a caracterização molecular dos isolados com o iniciador BOX permitiu a construção de um dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Dice. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Bionumerics 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

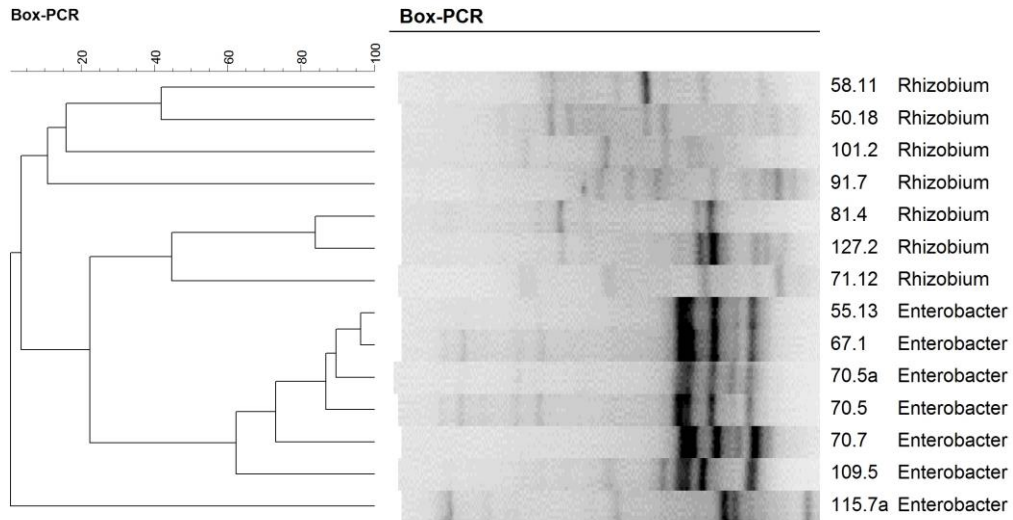
Foi obtida uma coleção de 14 bactérias isoladas de nódulos de raízes de amendoim cultivado por 40 dias em solos de Petrolina-PE e Barbalha-CE. Dentre as bactérias obtidas, sete pertenciam ao gênero *Rhizobium* e sete ao gênero *Enterobacter*. A presença de isolados bacterianos do gênero *Rhizobium* infectando nódulos de amendoim, contrasta com o encontrado para essa leguminosa que é predominantemente nodulada com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Resultado semelhante ao presente trabalho foi encontrado por Ibáñez et al. (2009), que ao avaliarem estirpes de nódulos de amendoim, verificaram a presença de estirpes dos gêneros *Rhizobium* e *Enterobacter* colonizando nódulos dessa leguminosa. Os perfis genômicos revelaram alto grau de polimorfismo entre os isolados. Os isolados foram separados de acordo com os gêneros. Foi possível observar a formação de quatro grupos principais, no entanto a maior parte dos isolados apresentaram perfis únicos de DNA. Os dados de similaridade com base na análise polifásica obtido pelo Coeficiente de Dice variaram entre 10% a 90% indicando alta diversidade genética entre os isolados analisados (**Figura 1**). O uso dessa técnica permite a detecção de um alto grau de polimorfismo entre os isolados (Chueire et al., 2000) o que permite uma análise genética detalhada dessas bactérias.

## CONCLUSÕES

Os isolados de *Rhizobium* e *Enterobacter* obtidos de nódulos de amendoim apresentam elevada variabilidade genética e podem ser bactérias com o potencial para promoção de crescimento em amendoim.

## REFERÊNCIAS

- SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: Santos, R. C. (ed.) O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.23-190.
- HOFFMAN, L.V.; SOUSA, M.S. JACOME, R.G. et al. Seleção de isolados de rizóbio para nodulação de amendoim. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas. v.11, n.2, p.107-111, 2007.
- VINCENT, J.M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).
- SANTOS, C. E. R. S. Diversidade de rizóbio nativo da região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. 178 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F. et al. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. Agricultura Tropical, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.
- IBAÑEZ, F. et al. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 40, p. 537-539, 2008.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade obtido a partir do Box-PCR entre bactérias do Gênero *Rhizobium* e *Enterobacter* isoladas de nódulos de amendoim.