

Amplificação de Genes Simbióticos e Produção de Ácido Indolacético *in Vitro* por Bactérias Isoladas de Nódulos de Mulungu e Angico

Symbiotic Gene Amplification and *in vitro* Indolacetic Acid Production by Bacteria Isolated from Mulungu and Angico Nodules

*Katherine Gomes Oliveira*¹; *Dalila Ribeiro Rodrigues*²; *Tailane Ribeiro do Nascimento*³; *Rejane de Carvalho Nascimento*³; *Indra Elena Costa Escobar*⁴; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*⁶

Resumo

Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias de nódulos radiculares das espécies mulungu (*Erythrina velutina* Willd) e angico [*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan] cultivadas em solos de áreas da Caatinga dos municípios de Serra Talhada, Petrolina, Caruaru e Garanhuns, no Estado de Pernambuco. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação nos solos das diferentes localidades por quatro meses. Os nódulos foram superficialmente desinfetados com hipoclorito de sódio e macerados em placas de Petri contendo o meio YMA com vermelho congo. Para a autenticação,

¹Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Semiárido

²Bióloga, Mestranda em Ciências Agrárias, UEPB, Campina Grande, PB

³Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. Estagiária da Embrapa Semiárido

⁴Bióloga, D.Sc em Biologia de Fungos. Bolsista PNPD, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Univasf, Petrolina, PE

⁶Biólogo, D.Sc em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. paulo.ivan@embrapa.br

os isolados foram avaliados quanto às amplificações de genes *nifH* e *nodC* em um duplex PCR. Os isolados com amplificações positivas foram utilizados para testar a capacidade de produção de ácido indolacético (AIA) em meio líquido. Das 180 bactérias obtidas, 87 foram selecionadas por apresentar amplificação positiva para ao menos um dos genes estudados. Dentre estas, 40 isolados foram selecionados para a avaliação da produção de AIA, sendo que sete isolados apresentaram produção de AIA iguais ou superiores ao observado para a estirpe de referência BR 3299, com destaque para M47 (mulungu) e A42 (angico) que apresentaram os maiores valores de síntese de AIA, indicando o potencial destes isolados na promoção do crescimento vegetal.

Palavras chave: fito-hormônio, áreas degradadas, rizóbio-leguminosa, inoculante.

Introdução

Espécies arbóreas nativas, como o mulungu e o angico, têm sido estudadas por causa do alto potencial dessas plantas nos processos de recuperação de áreas degradadas em regiões de Caatinga (ARAÚJO FILHO et al., 2007). O mulungu e o angico pertencem à família Fabaceae e se caracterizam por sua rusticidade e resistência à seca. Estas espécies apresentam capacidade de se associar com isolados de rizóbio capazes de fixar o N_2 atmosférico, tornando-o absorvível pelas plantas.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural realizado por bactérias denominadas bactérias diazotróficas. Dentre as associações de bactérias diazotróficas e espécies vegetais, a que é mais bem estudada e caracterizada é a simbiose rizóbio-leguminosa (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

Estudos de seleção de estirpes de rizóbio, quanto à sua capacidade de nodular e fixar o N, necessitam de uma etapa de autenticação em que os isolados são re-inoculados em seus hospedeiros em condições gnotobióticas. Entretanto, recentemente, um método molecular que emprega a reação conjunta para a amplificação de dois genes simbióticos foi desenvolvido por Fernandes Júnior et al. (2013), permitindo reduzir o número de isolados bacterianos que são avaliados em experimentos de casa de vegetação, poupando, assim, tempo e recursos.

Além da capacidade de fixar nitrogênio, essas bactérias podem promover o crescimento vegetal por meio de diversos mecanismos, como a produção de fito-hormônios, como o ácido indolacético (AIA), por exemplo (KUMARI et al., 2008). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a amplificação de genes simbióticos e a produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias isoladas de nódulos de plantas de mulungu e angico, cultivadas em solos de áreas de Caatinga dos municípios de Serra Talhada, Petrolina, Caruaru e Garanhuns, no Estado de Pernambuco.

Material e Métodos

Foi realizado o isolamento das bactérias a partir dos nódulos obtidos em um experimento de plantas-isca em condições de cada de vegetação. As sementes de angico e de mulungu foram plantadas e crescidas por um período de quatro e três meses, respectivamente, em vasos com amostras de solo de áreas de Caatinga dos municípios de Serra Talhada, Petrolina, Garanhuns e Caruaru. Após o cultivo, os nódulos foram destacados e lavados com água corrente. Os nódulos frescos (20 nódulos por planta) foram superficialmente desinfestados com hipoclorito de sódio, lavados com água destilada autoclavada por oito vezes, macerados com o auxílio de uma pinça e riscados em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com vermelho congo (VINCENT, 1970). Após o isolamento, as bactérias foram inoculadas sucessivas vezes no meio YMA até obtenção de colônias puras.

Todos os isolados foram submetidos à reação de Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, como estratégia de autenticação das bactérias (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (p/v) e visualizados em sistema de fotodocumentação com luz UV. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um dos fragmentos com o tamanho molecular desejado (360 pb para o *nifH* e 980 pb para o *nodC*).

Isolados *nifH* e/ou *nodC* positivos foram selecionados a partir de sua localidade de origem e hospedeiro para a avaliação da produção de AIA em meio líquido. Alíquotas de um pré-inóculo foram repicadas em meio líquido YMA com triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante durante sete dias. Após esse período, a densidade ótica (DO a 540 nm) foi ajustada para 0,3. As amostras ajustadas foram centrifugadas e 100 μ l de reagente de Salkowski foram adicionados

a 150 μl do sobrenadante e incubadas por 30 minutos no escuro. A determinação colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm. Para a estimativa da produção de AIA, foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de AIA: 0, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat.

Resultados e Discussão

Um total de 180 bactérias foi obtido dos nódulos das plantas de mulungu e angico. Dentre estas, 87 bactérias foram caracterizadas como portadoras dos genes *nifH* e/ou *nodC*. Para as plantas de mulungu, 19 bactérias apresentaram amplificação para o gene *nifH* e/ou *nifH+* *nodC*, sendo dez isoladas dos solos de Caruaru, um de Garanhuns e oito de Serra Talhada. Para o angico, foram isoladas 23 bactérias dos solos de Caruaru, nove de Garanhuns, 27 de Serra Talhada e oito de Petrolina (Tabela 1). Os solos de Petrolina apresentaram o menor número de isolados para as duas plantas-iscas. As plantas de mulungu apresentaram menor número de isolados do que as plantas de angico em todos os solos avaliados. Alguns fatores restringem a simbiose entre rizóbios e leguminosas, destacando-se a acidez do solo e os fatores nutricionais relacionados, competição por sítios de nodulação e baixa umidade de solo (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Tais condições de solos podem determinar problemas para a planta, bactéria e para a associação entre elas (ZAHN, 1999).

Tabela 1. Amplificação dos genes *nifH* e *nodC* de bactérias isoladas de nódulos de plantas de angico e mulungu

Áreas de coleta	Mulungu			Angico		
	Nº de isolados	Amplificação		Nº de isolados	Amplificação	
		<i>nifH</i>	<i>nifH+</i> <i>nodC</i>		<i>nifH</i>	<i>nifH+</i> <i>nodC</i>
Caruaru	10	9	1	23	18	5
Garanhus	1	1	-	9	6	3
Serra Talhada	8	8	-	27	18	9
Petrolina	0	-	-	9	8	1

Dentre as 87 bactérias isoladas de nódulos de angico e mulungu, 40 foram selecionadas para a avaliação da produção de AIA. Do total de bactérias avaliadas para a síntese de AIA via triptofano, sete isolados, sendo quatro de angico e três de mulungu, obtiveram produção igual ou superior ao observado pela estirpe BR 3299 de *Microvirga vignae*. Dentre estas bactérias, destacam-se os isolados M47 e A42 que apresentaram os maiores valores de síntese de AIA (Figura 1).

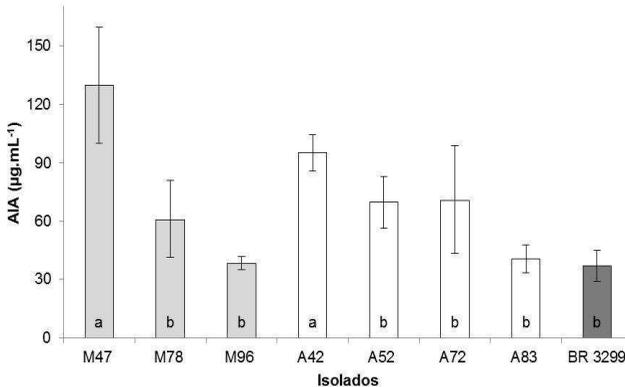


Figura 1. Síntese de ácido indolacético (AIA) por bactérias isoladas de nódulos de angico e mulungu. Colunas cinza claro: isolados de mulungu; Colunas brancas: isolados de angico; Coluna cinza escuro: estirpe de referência. Colunas com a mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott ($p < 0,01$). Barras representam o erro padrão da média.

Conclusões

Aproximadamente 50% dos isolados obtidos apresentou amplificação positiva para ao menos um dos genes simbióticos estudados.

Dentre os isolados avaliados quanto à produção de AIA, dois se destacaram por superar a estirpe de referência.

Referências

ARAÚJO FILHO, J.; SOUSA, F. B. A.; SILVA, N. L.; BEZERRA, T. S. Avaliação de leguminosas arbóreas, para recuperação de solos e repovoamento em áreas degradadas, Quixeramobim-CE. **Revista Brasileira de Agroecologia**. Cruz Alta, v. 2, p. 1592-1595. 2007.

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).

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).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. **Field Crops Research**, Saint Paul, v. 65, n. 1, p. 151-164, 2000.

KUMARI, B. S.; RAM, M. R.; MALLAYAH, K. V. Studies on exopolisaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. **African Journal of Microbiology Research**, Sapele, v. 3, p. 10-14, 2008.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology Reviews**, New York, v. 63, n. 9, p. 968-969, 1999.