

# Diversidade Genética de Bactérias Isoladas de Nódulos de Feijão-caupi Cultivado em Solos com e sem a Aplicação de Biochar

Genetic Diversity of Bacteria Isolated of Root Nodules of Cowpea Grown in Soil with and without Biochar Application

---

*Gilmar Silva Oliveira<sup>1</sup>; Thâmara Layse de Souza<sup>2</sup>; Bianca Maria Coelho dos Santos Barreto<sup>2</sup>; Diana Signor<sup>3</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>4</sup>*

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of rhizobia isolated from cowpea nodules [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] grown in soils with biochar amendments. The assay was conducted in 3 L pots in a greenhouse, the cowpea (BRS Marataoã) was used as trap host and sown in soils with 60 g kg<sup>-1</sup> of biochar. After the bacterial isolation the amplification of 16 rRNA gene was carried out to evaluate their Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) profiles with 3 endonucleases. A total of 22 bacteria were obtained and evaluated. The similarity dendrogram generated two

---

<sup>1</sup>Mestrando em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), bolsista Capes, Campina Grande, PB.

<sup>2</sup>Estudantes de Ciências Biológicas, Universidade Pernambuco (UPE), estagiárias da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>3</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>4</sup>Biólogo, D.Sc. em Ciências do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

clusters of isolates, one rare, represented by only one bacterium and one larger, represented by 21 bacteria, which was divided into four subgroups; however, in three of the subgroups belonging to group 1, the predominance of bacteria from plants that grew in soils with biochar were observed. These results indicated that the additions of biochar could influenced the rhizobial diversity.

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

**Keywords:** rhizobia, ARDRA, biological nitrogen fixation.

## Introdução

Os processos de transformação de nitrogênio (N) no solo (imobilização, mineralização, nitrificação e desnitrificação) são ordinariamente afetados por micróbios, e a mudança na estruturada comunidade microbiana e atividade podem influenciar na cicagem de N (ABUJABHAH, 2017).

A maioria das leguminosas se associa simbioticamente com rizóbios, bactérias fixadoras de N que se alojam em nódulos radiculares. Os diferentes sistemas de manejo do solo podem influenciar na diversidade e eficiência das bactérias nativas do solo. Dessa forma, faz-se necessário o levantamento da diversidade de bactérias em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo.

O biochar, ou biocarvão, é qualquer material rico em carbono obtido de biomassa carbonizada para uso como condicionador de solos (MAIA, 2010). O crescente uso desse produto, resultante de pirólise, tem sido uma forma de amenizar os impactos das práticas agrícolas convencionais sobre as mudanças climáticas, o que motiva muitos estudos para se determinar os impactos positivos e negativos do biochar sobre as propriedades físicas e principalmente as atividades e a abundância microbiana (LEHMANN et al., 2011).

A adição de biochar pode ter um impacto significativo nas propriedades químicas e físicas do solo que, conseqüentemente, afetam os processos bioquímicos e, por sua vez, as atividades microbianas (ABUJABHAH et al., 2016). Abujabhah et al. (2017), estudando o efeito de quatro doses de biochar no solo, constataram mudanças significativas nas estruturas das comunidades microbianas do solo, principalmente quanto ao grupo das bactérias fixadoras de N. Existem poucos resultados disponíveis na literatura

científica referentes à avaliação dos efeitos da aplicação do biochar na diversidade de rizóbios em solos do Brasil, especialmente na região semiárida.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a diversidade genética de rizóbios isolados de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivado em solos com e sem a aplicação de biochar como condicionante de solo.

## Material e Métodos

O Experimento foi realizado em casa de vegetação na sede da Embrapa Semiárido. Para o ensaio, foi utilizado biochar, produzido a partir de algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC]. A cultivar de feijão-caupi BRS Marataoã foi utilizada como planta isca e semeada em vasos com volume de 3 kg. O solo utilizado foi um Argissolo proveniente do Campo Experimental de Bebedouro, pertencente à Embrapa Semiárido.

Para o enchimento dos vasos, foi utilizado solo peneirado, pesado e suplementado com uma dose de 180 g (60 g kg<sup>-1</sup>) de biochar homogeneizado ao solo. Vasos também foram preenchidos com solo sem adição de biochar. As sementes foram previamente desinfestadas superficialmente com etanol 96 °GL (30 segundos), hipoclorito de sódio (2 minutos) e, em seguida, foram realizadas oito lavagens em água destilada e esterilizada (ADE). Após a semeadura, a água foi fornecida sempre que necessário. Aos 40 dias após a emergência, as plantas foram coletadas.

Para o isolamento dos nódulos, os mesmos foram removidos das raízes das plantas, lavados com água de torneira e desinfestados superficialmente com em etanol 96 °GL (30 segundos), hipoclorito de sódio 2% (4 minutos) seguido de oito lavagens em ADE. Após a desinfestação, os nódulos foram esmagados em placas de Petri como meio YMA (VINCENT, 1970). Ao se constatar o crescimento das colônias, as bactérias foram purificadas novamente em placas de Petri com meio YMA com azul de bromotimol até que se obtivessem colônias puras.

As bactérias purificadas foram crescidas em YM Líquido e o DNA dos isolados foi extraído com o kit comercial. A reação de PCR para a amplificação do gene 16S rRNA foi dimensionada para 20 µl, contendo reação tampão de 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, dNTP 0,42 mM, Taq DNA polimerase 1,0 mM, água, 0,20 µl de cada *primer* iniciador.

Os iniciadores universais 27F (GAGTTTGATCCTGGTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991) foram utilizados. A amplificação se consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, e 72 °C por 2 minutos com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE a 0,5X.

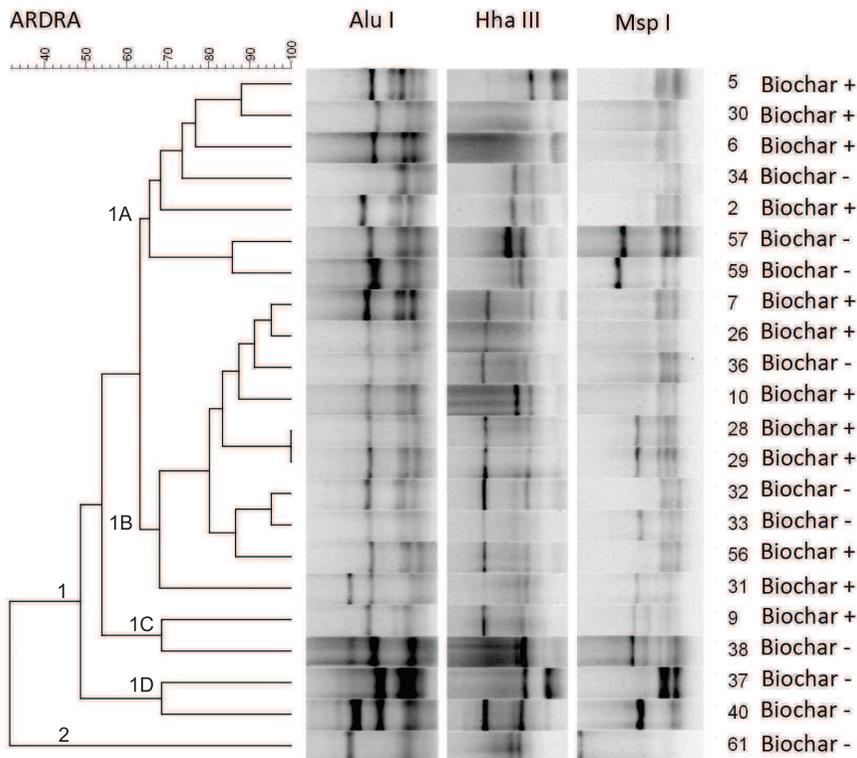
Para a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), as reações de digestão do DNA foram utilizadas as endonucleases *Alu I*, *Hha III* e *Msp I*, seguindo-se as orientações do fabricante. O material digerido foi analisado em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, aplicando-se uma voltagem de 100 V por 3 horas.

Os géis foram observados em transluminador com luz UV e fotografados. A avaliação dos perfis de similaridade dos isolados foi realizada com base no coeficiente de Dice, com tolerância de 2%. Os perfis de agrupamento foram feitos no programa BioNumerics 7.1.

## Resultados e Discussão

Foram obtidas 22 culturas purificadas de rizóbios que apresentaram diferentes perfis de ARDRA. No dendrograma de similaridade é possível observar que todos os isolados apresentaram em torno de 30% de similaridade. Houve a formação de dois grupos principais, sendo um deles originário do solo sem carvão e formado por apenas um isolado (Figura 1). As demais 21 bactérias apresentaram em torno de 50% de similaridade e se dividiram em quatro subgrupos com bactérias oriundas de plantas cultivadas em solos com e sem a aplicação do biochar.

O subgrupo 1A, composto por sete bactérias, apresentou mais de 60% de similaridade, sendo quatro isolados do solo tratado com o biochar (5, 30, 6 e 2) e três isolados do solo sem biochar (34, 57 e 59). Ainda no subgrupo 1A, os maiores graus de similaridade foram entre os isolados (5 e 30), em torno de 88%, ambos tratados com o biochar, e entre os isolados (57 e 59), 86%, ambos sem o tratamento com o biochar.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivados em solo com e sem aplicação de biochar (Biochar + e Biochar-), por meio da técnica de ARDRA, utilizando as enzimas de restrição *Alu* I, *Hha* III e *Msp* I.

O subgrupo 1B, com dez isolados, apresentou similaridade em torno de 65%. Das dez bactérias deste subgrupo, sete (7, 26, 10, 28, 29, 56 e 31) foram provenientes do solo suplementado com o biochar, enquanto apenas três (36, 32 e 33) foram obtidas de plantas cultivadas em solo sem a suplementação do biochar. Ainda no subgrupo 1B, dois isolados (28 e 29) apresentaram grau de 100% de similaridade, ambos advindos do solo suplementado com o biochar. O subgrupo 1C apresentou similaridade de aproximadamente 68%, porém, este grupo é representado por apenas duas bactérias (9 e 38); respectivamente, uma do Argissolo tratado com biochar e a outra sem tratamento.

Assim, como o subgrupo 1C, o subgrupo 1D também apresentou similaridade de 68%, sendo representado por apenas dois isolados. No entanto, diferente do subgrupo 1C, as duas bactérias representantes no subgrupo 1D (37 e 40) foram provenientes do solo sem carvão.

Dos quatro subgrupos do grupo 1 (1A, 1B, 1C e 1D), em três deles (1A, 1B e 1C) houve predominância de bactérias isoladas do solo tratado com biochar, indicando que a aplicação do biocarvão promove mudanças na comunidade microbiana do solo. Abujabhah et al. (2017) afirmam que o biochar promove alterações significativas nas características físico-químicas do solo, o que pode favorecer alguns grupos de micro-organismos por promover um ambiente propício a um melhor desenvolvimento.

O grupo 2, com apenas um isolado (61), mesmo apresentado similaridade em torno de 30% com os demais isolados do grupo 1, se distanciou, caracterizando um grupo raro no dendograma. Um resultado semelhante foi encontrado por Brasil et al. (2005), estudando a diversidade genética de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras. Para estes autores, esse fato se deve a uma bactéria, provavelmente, pertencente a uma nova espécie.

## Conclusão

A adição de biocarvão resulta na alteração da comunidade de rizóbios capaz de nodular o feijão-caupi no solo estudado. Novos estudos taxonômicos são necessários para avaliar a composição da comunidade rizobiana isolada neste experimento.

## Referências

ABUJABHAH, I. S.; DOYLE, R.; BOUND, S. A.; BOWMAN, J. P. The effect of biochar loading rates on soil fertility, soil biomass, potential nitrification, and soil community metabolic profiles in three different soils. *Journal of Soils and Sediments*, Berlin Heidelberg, v. 16, n. 2, p. 2211-2222, 2016

ABUJABHAH, I. S.; DOYLE, R.; BOUND, S. A.; BOWMAN, J. P. Assessment of bacterial community composition, methanotrophic and nitrogen-cycling bacteria in three soils with different biochar application rates. *Journal of Soils and Sediments*, Heidelberg, Sec 3. may. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11368-017-1733-1.pdf>>. Acesso em 12 ago. 2017

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 179-190. 2005.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES J.; MASIELLO C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. (2011) Biochar effects on soil biota: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1812-1836. 2011.

MAIA, C. M. B. F. Biochar uma nova ferramenta no manejo de solos. n: SEMINÁRIO DE ATUALIZAÇÃO FLORESTAL, 2.; SEMANA DE ESTUDOS FLORESTAIS, 11., Irati, 2010. **Legislação florestal e o Código Florestal Brasileiro**: anais. Irati: Unicentro, 2010. 1 CD-ROM.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria** London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).