

Diversidade Genética de Bactérias Isoladas de Nódulos de Feijão-caupi Cultivado em Solos sob Diferentes Sistemas em Juazeiro, BA

Genetic Diversity of Bacteria Isolated from Cowpea Root Nodules Grown in Soils under Different Crop Systems in Juazeiro, BA.

Pâmella Thalita Souza Sena¹; Lucas Sampaio Araujo²; Reginaldo Alves Ferreira Neto³; Lindete Míria Vieira Martins⁴; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁵

Abstract

This study aimed to determinate the diversity of rhizobia from sols of Lower half São Francisco Valley with cowpea crop systems applying the IGS-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Intergenic spacer) technique. The soils were collected from seven different areas in Juazeiro-BA. Two cowpea cultivars were used to trap native rhizobia in greenhouse conditions and isolates with typical characteristics of bradyrhizobia were selected to further analysis. Genetic analysis of isolates was done

¹Mestranda em Agronomia (Horticultura Irrigada), Universidade do Estado da Bahia (Uneb), bolsista Capes, Juazeiro, BA.

²Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs) bolsista Capes, Feira de Santana, BA.

³Doutorando em Tecnologias Energéticas Nucleares, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), bolsista Facepe, Recife, PE.

⁴Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciência do Solo, professora titular do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais da Uneb, Juazeiro, BA.

⁵Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

using IGS-RFLP. The UPGMA clustering showed that the 46 bacteria clustered into 2 main groups by crop systems. The areas evaluated revealed the high diversity of rhizobial isolates.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, IGS, nodulantes, Semiárido, Nordeste do Brasil.

Keywords: *Vigna unguiculata*, IGS, nodulates, Semi-Árid, Northeastern Brazil.

Introdução

O Submédio do Vale do São Francisco tem se destacado pelo seu potencial agrícola que, aliado ao uso da irrigação, se torna referência na agricultura nacional. Associado ao avanço agrícola, está a intensificação do uso dos solos que pode alterar a estrutura das comunidades bacterianas (YAN et al., 2014). No grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio (N), os rizóbios são capazes de se associar a leguminosas e suprir totalmente a demanda de N pela planta hospedeira. Atualmente, diversos trabalhos são realizados com objetivo de conhecer a diversidade dessas bactérias e selecionar estirpes que sejam competitivas e eficientes como inoculantes, principalmente para serem usadas em leguminosas produtoras de grãos (LEITE et al., 2009; MARINHO et al., 2017).

Estudos de diversidade requerem técnicas rápidas e de fácil aplicação para diferenciar os microsimbiontes (GIONGO et al., 2008) e, segundo Jaiswal et al. (2017), a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região intergênica entre os genes 16S-23S rRNA (IGS - Intergenic spacer region) (IGS-RFLP) é uma técnica que possui grande poder discriminatório, sendo suficiente para agrupar estirpes com robustez filogenética.

Tendo em vista a influência dos diferentes sistemas de cultivo sobre os micro-organismos nativos, o objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em solos sob diferentes sistemas de cultivo desta leguminosa por meio do uso da técnica de IGS-RFLP.

Material e Métodos

O estudo foi realizado com sete amostras de solos coletadas em diferentes áreas do Município de Juazeiro, BA.

Nas áreas 1 e 2, as coletas foram realizadas no Perímetro Irrigado de Mandacaru com (1) cultivo simultâneo de manga (*Mangifera indica* L.) e feijão-caupi nas entrelinhas; (2) rotação de cultura com feijão-caupi e cebola (*Allium cepa* L.). Na área 3, pertencente ao Instituto Regional da Pequena Agropecuária Apropriada (Irapaa), foi realizada a coleta de solo onde há a aplicação da rotação de culturas com mucuna (*Mucuna pruriens* L.) e crotalária (*Crotalaria juncea* L.), ambas irrigadas. A área 4 – Campo Experimental da Universidade do Estado da Bahia (Uneb) – foi realizada a coleta de solo de área cultivada com feijão-caupi irrigado. As áreas 5 e 6 consistiram de áreas de produtores de feijão-caupi em dependência de chuva com e sem a adubação nitrogenada, respectivamente. E a área 7 foi na Caatinga, com predomínio de cactos (Cactaceae), jurema (*Mimosa tenuiflora*) e caroá (*Neoglaziovia variegata*).

Os isolados foram obtidos em experimento de planta-isca com os solos coletados nas áreas descritas acima utilizados como substrato para o cultivo do feijão-caupi. Como plantas-isca foram utilizados dois genótipos de feijão-caupi: a variedade BRS Acauã e um acesso local (*landrace*) “Canapu Ligeiro”.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por 40 dias e os nódulos (dez por planta) foram isolados e purificados em meio YMA, conforme descrito por Leite et al. (2009). Os isolados com hábito de crescimento lento e intermediário com reação alcalina no meio de cultura foram selecionados para as avaliações subsequentes. Para a extração do DNA, utilizou-se o kit de extração de DNA genômico *Wizard Genomic DNA Purification kit*. Todos os isolados foram avaliados quanto à amplificação do gene *nodC* de acordo com Fernandes Júnior et al. (2013).

A amplificação do IGS foi realizada segundo a metodologia apresentada por Tampakaki et al. (2017), com adaptações. Após a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), uma alíquota do produto de reação foi corada com Gelred e submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (p/v) a 120 V por 1 hora. O produto do

PCR do IGS foi digerido a *overnight* a 37 °C com as endonucleases *Hae* I, *Alu* I e *Hind* III. Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) a 100 V por 4 horas. As imagens foram visualizadas sob luz UV em fotodocumentador.

As imagens dos géis foram analisadas com o programa Bionumerics version 7.1. O dendrograma de dissimilaridade foi elaborado pelo método de agrupamento UPGMA, usando-se o coeficiente de similaridade de Dice.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 48 bactérias isoladas dos nódulos dos dois genótipos de feijão-caupi nas sete diferentes amostras de solo. Destas bactérias, 46 foram positivas para a amplificação do gene *nodC*. A análise dos perfis de restrição evidenciou a presença de dois grupos com similaridade em torno de 95% pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Dice (Figura 1).

Observa-se agrupamento pelo uso do solo, a exemplo do grupo 1, composto por oito indivíduos, no qual foram encontrados apenas isolados advindos de áreas irrigadas (rotação de cultura com feijão-caupi – cebola e consórcio de manga e feijão-caupi), constatando-se ausência de isolados oriundos de áreas de cultivo em sequeiro. Vale ressaltar que, para esse grupo, a área com consórcio (manga – feijão-caupi) apresentou isolados apenas na cultivar BRS Acauã.

O grupo 2 foi formado por 40 indivíduos e se dividiu em dois subgrupos. O subgrupo 2a foi formado por dez isolados, sendo todos eles provenientes de manejo irrigado. No subgrupo 2b, formado pelos demais isolados, foi observada a presença de isolados provenientes de todas as amostras de solos e cultivares, não havendo o mesmo padrão de agrupamento, indicativo de variabilidade interespecífica. Jaiswal et al. (2017) também relataram falta de padrão de agrupamento para bradyrízobios em amendoin (*Arachis hypogaea* L.) na África do Sul, sendo possível encontrar isolados de uma mesma área em diferentes grupos e de áreas diversas nos mesmos grupos, indicando a elevada diversidade de rizóbio nos solos do Semiárido, corroborando estudos anteriores (LEITE et al., 2009; MARINHO et al., 2017).

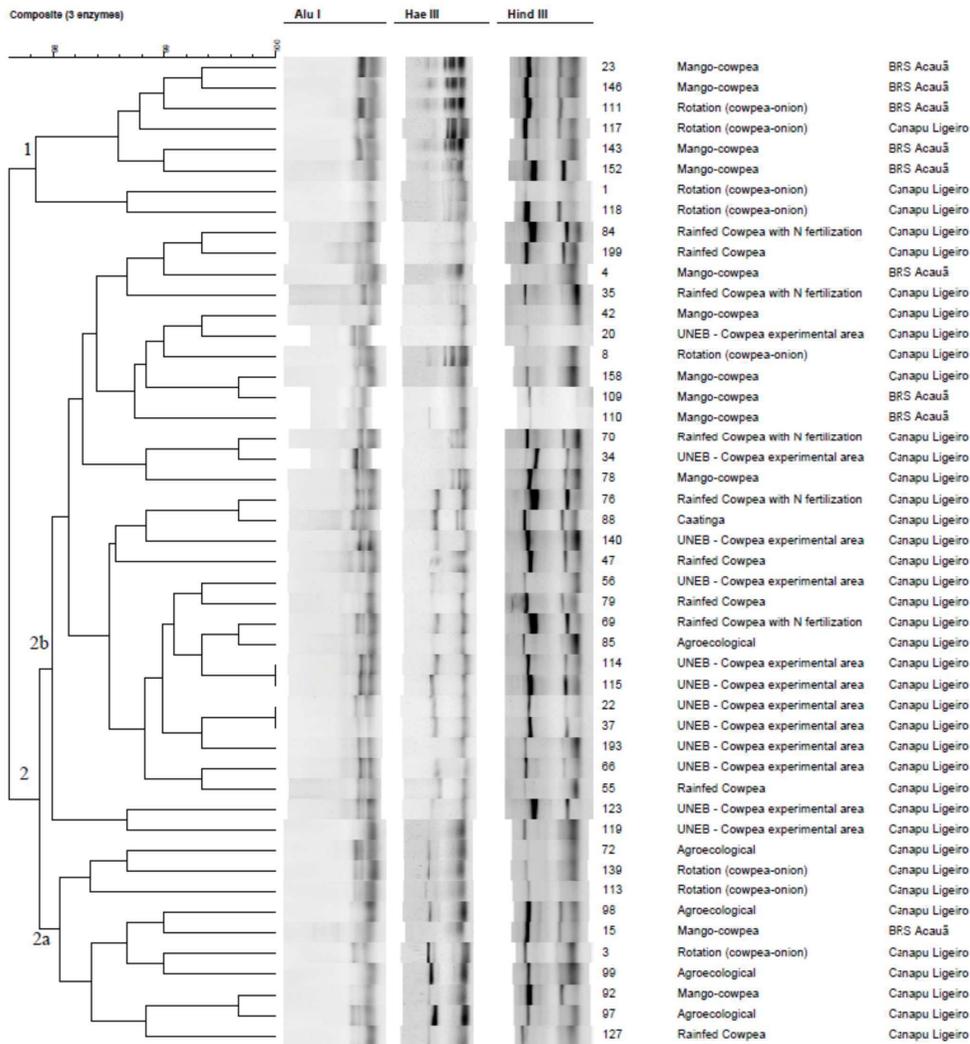


Figura 1: Dendrograma gerado a partir do padrão de bandas da restrição de IGS (16S-23S rDNA) RFLP digerido com as enzimas de restrição *Hae* III, *Hind* III e *Alu* I de isolados de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], obtidos de áreas com diferentes usos de solo em Juazeiro, BA.

Conclusão

A análise molecular por IGS-RFLP evidenciou diversidade entre os isolados estudados, enfatizando a influência dos diferentes sistemas de cultivo sobre a comunidade rizobiana.

Agradecimentos

À Embrapa Semiárido, à Universidade do Estado da Bahia (Uneb) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

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, 58). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98607/1/COT158.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2017.
- GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 3 p. 261-269, 2008.
- JAISWAL S. K.; MSIMBIRA, L. A.; DAKORA, F. D. Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 40, p. 215-226, 2017.
- LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.
- MARINHO, R. de C. N.; FERREIRA, L. de V. M.; SILVA, A. F. da; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 2, p. 273-281, 2017.
- TAMPAKAKI, A. P.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 40, n.3, p.179-189, 2017.
- YAN, J.; HAN, X. Z.; JI, Z. J.; LI, Y.; WANG, E. T.; XIE, Z. H.; CHEN, W. F. Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 80, n. 17, p. 5394-5402, 2014.