

# Diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de *Vigna radiata* cultivado em solos do Semiárido

Jéssica Caroline Souza Santos<sup>1</sup>; Valéria Borges da Silva<sup>2</sup>; Eliomara Carmo Pereira<sup>3</sup>; Adailson Pereira de Souza<sup>4</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>5</sup>

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de rizóbios de nódulos de *Vigna radiata* nativos de solos de cinco municípios do Semiárido. As comunidades rizobianas foram isoladas a partir de um experimento com planta-isca nas dependências da Embrapa Semiárido. Após o isolamento e purificação, o DNA foi extraído, realizou-se a amplificação simultânea dos fragmentos dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* e, para os isolados positivos, amplificou-se o gene 16S rRNA para a realização do ARDRA, utilizando-se as enzimas *Hha* e *AluI*. Foram obtidos 115 isolados, dos quais 66 foram positivos para a amplificação dos genes *nodC* e *nifH*. A análise dos perfis de restrição dos isolados revelou a presença de dois grandes grupos representados por 47  $\alpha$ -rizóbios e 19  $\beta$ -rizóbios, com perfis genéticos muito diversos, podendo haver isolados ainda não descritos.

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

## Introdução

No Nordeste brasileiro, a exploração agrícola é responsável por geração de empregos e renda. Nessa região, nos sistemas de base familiar para a

<sup>1</sup>Estudante de Biologia – UPE, bolsista IC/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Doutoranda em Ciência do Solo (PPGCS - CCA), UFPB, Areia, PB, Professora do Instituto Federal do Piauí-IFPI.

<sup>3</sup> Estudante de Biologia – UPE, Petrolina, PE.

<sup>4</sup>D.Sc. em Fitotecnia, professor da UFPB - CCA, Areia, PB.

<sup>5</sup>Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

produção de grãos, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) apresenta grande importância econômica, social e cultural. No Semiárido, onde não é comum a utilização de adubação para a cultura, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode ser considerada a maior fonte deste elemento, contribuindo para sua produtividade (Freitas et al., 2010).

O feijão-caupi é capaz de estabelecer simbiose com diversos grupos de rizóbios, apresentando uma ampla faixa hospedeira. Apesar de já existirem estirpes recomendadas para a cultura, a eficiência da inoculação pode ser baixa, principalmente em solos com população rizobiana estabelecida. Diversos trabalhos estão sendo realizados com o intuito de conhecer a diversidade de bactérias nativas nos solos da região e selecionar estirpes que sejam competitivas e eficientes na fixação de N no feijão-caupi (Leite et al., 2009; Marinho et al., 2017).

Por ser uma leguminosa tolerante à seca, de ciclo curto e extremamente adaptada ao cultivo em regiões semiáridas, o feijão-mungo (*Vigna radiata*) pode ser acessado por comunidades bacterianas diferenciadas das comumente associadas a *V. unguiculata*, já cultivado. Esta pode ser uma abordagem interessante na prospecção de rizóbios nativos promissores.

A identificação de bactérias com potencial para fixação biológica de N, adaptadas às condições edafoclimáticas, possui implicações práticas importantes no entendimento da biodiversidade e na recomendação de novas estirpes como inoculantes para o feijão-caupi.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de *V. radiata* em solos de Caatinga do Semiárido.

## Material e Métodos

Foi realizado um ensaio, utilizando *V. radiata* como planta-isca, com o objetivo de isolar rizóbios de solos de Caatinga. As amostras de solos foram coletadas de áreas dos municípios de Teresina, PI (Latossolo); Paulistana, PI (Luvissole); Uauá, BA (Planossolo); Juazeiro, BA (Neossolo flúvico) e Petrolina, PE (Argissolo).

As plantas foram cultivadas por 35 dias em viveiro com sombrite (70% de luminosidade) nas dependências da Embrapa Semiárido, sendo irrigadas diariamente com água destilada autoclavada. Na coleta, as raízes foram separadas da parte aérea, lavadas e os nódulos foram desinfestados (Vincent, 1970). Com o auxílio de uma pinça esterilizada por flambagem, dez nódulos de cada planta foram macerados em placas de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970) e repicados sucessivamente até obtenção de culturas puras.

Todos os isolados crescidos tiveram o DNA extraído pelo método de lise alcalina das células, adaptado de Wang et al. (1993). Em seguida, foram submetidos à amplificação de genes simbióticos *nodC* e *nifH* para alfa e beta-rizóbios, em uma reação de duplex PCR (Silva et al., 2019).

Os isolados com amplificação positiva para os genes simbióticos foram avaliados quanto a sua diversidade genética pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA). Para isso, amplificou-se o gene 16S com os iniciadores universais Y1 e Y3. As digestões foram realizadas com as endonucleases *HhaI* e *AluI*, seguindo-se a metodologia indicada pelo fabricante.

A técnica de ARDRA também foi aplicada às 14 estirpes de referência. As imagens dos géis foram visualizadas e registradas em fotodocumentador com luz UV e analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica), empregando-se o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 115 isolados de nódulos de *V. radiata* em todas as amostras de solo. A maior representatividade, em número de isolados, foi observada em Juazeiro, BA (39%), Teresina, PI (27,8%) e Uauá, BA (17,4%) (Tabela 1), evidenciando-se o efeito das diferentes áreas de coleta de solos no quantitativo da comunidade bacteriana isolada dos nódulos de *V. radiata*.

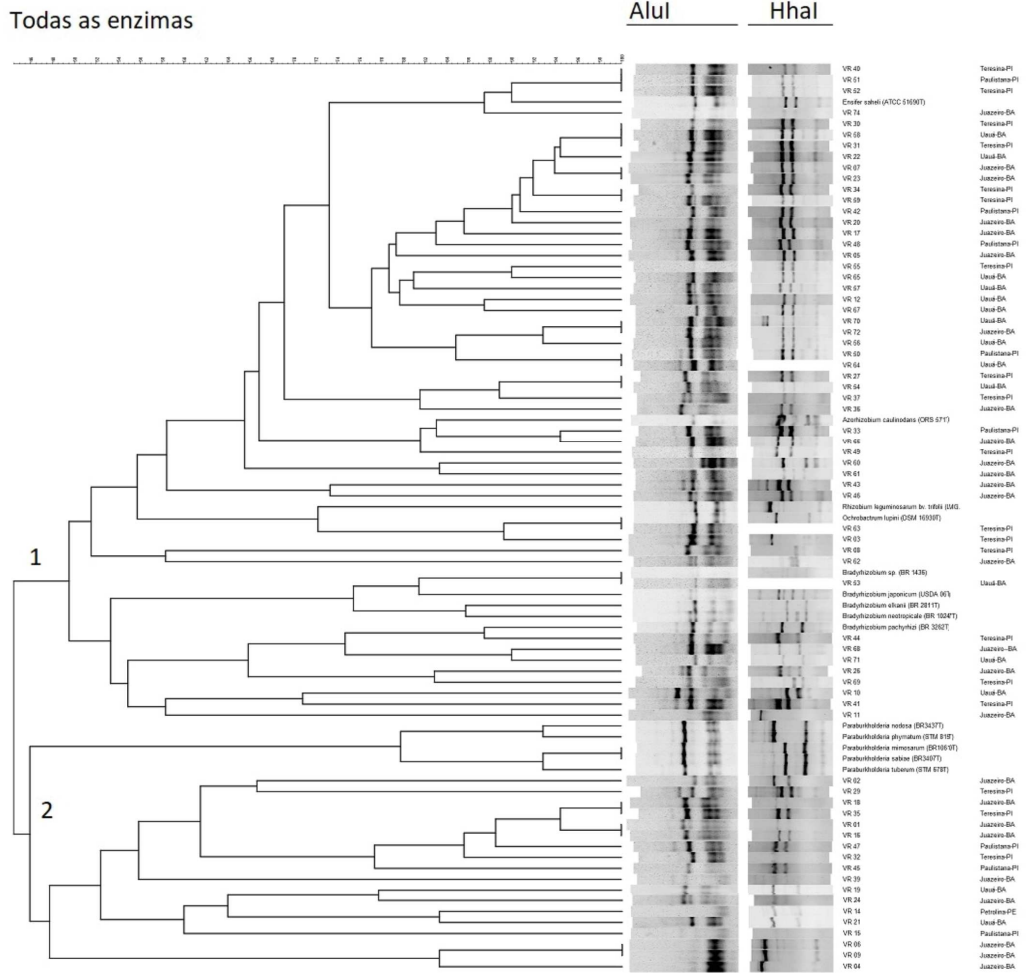
**Tabela 1.** Quantitativo de isolados e proporção entre alfa e beta-rizóbios de nódulos de *Vigna radiata* em diferentes solos do Semiárido.

Local	Nº de isolados	Genes simbióticos (+)	Grupo 1 Alfa-rizóbios (+)	Grupo 2 Beta-rizóbios (+)
Teresina, PI	32	16	13	3
Paulistana, PI	11	8	5	3
Uauá, BA	20	17	15	2
Petrolina, PE	7	5	4	1
Juazeiro, BA	45	20	11	9
Total	115	66	48	18

Do total de isolados, 66 amplificaram os genes *nodC* e *nifH* (Tabela 1), para os quais a análise dos perfis de restrição revelou a presença de dois grandes grupos, separados nas subclasses dos  $\alpha$ - e  $\beta$ -rizóbios, com similaridade em torno de 45%. O grupo 1, formado por  $\alpha$ -rizóbios, apresentou 48 isolados, enquanto no grupo 2 foram identificados 18  $\beta$ -rizóbios.

Em todas as áreas de coleta de solos, constatou-se a presença das duas subclasses de rizóbio, sendo o maior número de  $\beta$ -rizóbios observado no Neossolo flúvico (50%). A superioridade em número de isolados de  $\alpha$ -rizóbios, em relação ao de beta, indica que, apesar destes estarem distribuídos por todo o Semiárido, ocorre o predomínio dos primeiros. Assim como neste estudo, Leite et al. (2009), por meio da técnica de ARDRA, verificaram grande variabilidade genética dos isolados, com predomínio de  $\alpha$ -rizóbios em solos da região do Vale do São Francisco.

A baixa similaridade entre os isolados dentro dos grupos, em torno de 46%, indica a presença de perfis muito diversos. No grupo dos  $\alpha$ -rizóbios, o subgrupo formado por bactérias próximas às estirpes referência de *Bradyrhizobium* apresentou apenas isolados oriundos de Juazeiro, BA, Teresina, PI e Uauá, BA. Frequentemente, o pH pode ser um fator determinante na diversidade bacteriana do solo. Neste estudo, estes solos apresentaram pH mais elevado. Segundo Kapembwa et al. (2016), o pH baixo pode limitar o desenvolvimento de *Bradyrhizobium* por causa da sensibilidade desse gênero à acidez do solo.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de restrição do gene 16S rDNA de novos isolados de *Vigna radiata* e de estirpes de referência, utilizando-se as endonucleases *Hha* e *AluI*.

Os subgrupos formados por  $\alpha$ -rizóbios com isolados posicionados próximos a *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>), *Ensifer saheli* (ATCC 51690<sup>T</sup>) e *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (LMG 8820<sup>T</sup>) tiveram representantes de todas áreas de coleta de solo avaliadas. Entretanto, não foi possível constatar uma relação biogeográfica entre estes grupos e a origem dos isolados.

Assim como neste estudo, comumente são relatadas relações simbióticas de *Vigna* com bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia* (Zilli et al., 2009). No entanto, nenhum dos 66 isolados apresentou 100% de similaridade com qualquer uma das estirpes de referência utilizadas, o que sugere a presença de rizóbios ainda não descritos.

## Conclusões

A técnica de ARDRA revelou grande diversidade entre os isolados e enfatizou a influência das diferentes classes de solo sobre a comunidade rizobiana de  $\alpha$ - e  $\beta$ -rizóbios.

As populações rizobianas isoladas de *V. radiata*, nativas nos solos do Semi-árido, apresentam perfis genéticos muito diversos, podendo haver rizóbios ainda não descritos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa (23.16.05.16.00.00) e ao CNPq (311218/2017-2) pelo financiamento, à Universidade do Estado de Pernambuco, à Universidade Federal da Paraíba e ao Instituto Federal do Piauí, pelo apoio institucional.

## Referências

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 344-349, 2010.

KAPEMBWA, R.; MWEETWA, A. M.; NGULUBE, M.; YENGWE, J. Morphological and biochemical characterization of soybean nodulating rhizobia indigenous to Zambia. **Sustainable Agriculture Research**, v. 5, p. 84-96, 2016.

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**, 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**, v. 76, n. 2, pp. 273-281, 2017.

SILVA, V. B.; SILVA, A. F.; SILVA, T. R.; SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F.; SOUZA, A. P.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Fast and efficient symbiotic gene-based duplex PCR approach for the preliminary selection of legume root nodule bacteria. **Rhizosphere**, v. 10, p. 1-4, 2019.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodules bacteria**. Oxford: Blackwell Science Publication, 1970.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 4153-4154, 1993.

ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 749-758, 2009.