

Diversidade genética baseada no PCR-RFLP dos genes *16S-rRNA* E *recA* de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos virgens dos Cerrados

Fábio Plotegher¹; Iêda Carvalho Mendes²; Mariangela Hungria³. ¹Bolsista de IC do CNPq; ²Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; ³Embrapa Soja.

Introdução

Atualmente, o feijão (*Phaseolus vulgaris*), faz parte da base de alimentação de cerca de 300 milhões de pessoas, especialmente na América Latina, no sul e leste da África. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor mundial de feijão, contudo, os rendimentos médios nacionais são bastante baixos, de apenas 789 kg/ha, na safra 2005/2006. O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos pouco férteis, especialmente pobres em nitrogênio (N₂), contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N₂ pela simbiose com bactérias diazotróficas representaria uma alternativa para incrementar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de contribuir para uma menor emissão de gases causadores do efeito estufa. Para o estabelecimento de uma simbiose efetiva, é necessário, porém, maior conhecimento da diversidade dos rizóbios nativos de cada local.

A região dos Cerrados é, hoje, responsável pela maior produção de grãos no Brasil. Alguns estudos sobre a diversidade genética de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro, em áreas sob cultivo com essa leguminosa, foram conduzidos e indicam diversidade genética e simbiótica bastante elevada (Mostasso et al., 2002). Contudo, pouco se conhece sobre a diversidade de rizóbios em áreas virgens dos Cerrados, bem como sobre o impacto do estabelecimento da agricultura nessa população nativa. Como o feijoeiro

é considerado planta promíscua para nodulação, este trabalho tem por objetivo caracterizar geneticamente rizóbios capturados por essa leguminosa em áreas virgens dos Cerrados e compará-los com as populações de áreas sob cultivo.

Materiais e Métodos

Foram coletados nódulos das raízes de feijoeiro em diversas áreas dos Cerrados nunca cultivadas anteriormente. Procedeu-se ao isolamento das bactérias desses nódulos, sendo obtidos 186 isolados. A capacidade de nodulação e fixação biológica do N₂ desses isolados foi confirmada em experimento feito com vasos de Leonard em casa-de-vegetação.

O DNA das bactérias foi extraído, quantificado e amplificado pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction") com o "primer" BOX-A1R, segundo Kaschuk et al. (2006). Como padrões em todas análises, foram utilizadas sete estirpes representativas das espécies de rizóbios que nodulam o feijoeiro. Considerando um nível de similaridade de 70%, foram obtidos 99 perfis distintos.

O DNA dessas 99 bactérias foi amplificado com "primers" (fD1' e rD1) que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA, segundo Germano et al. (2006). Os produtos dessas amplificações foram submetidos à metodologia de RFLP (restriction fragment length polymorphism) – PCR, com três enzimas de restrição, *Rsa* I, *Msp* II, *Hae* III.

A partir do novo dendrograma, foram selecionados 33 isolados. O DNA dessas bactérias foi amplificado com os "primers" para a região do gene *recA* descritos por Payne et al. (2005): Bur 1 (5'GATCGA(AG)AAGCAGT CGGCAA – 3') e Bur 2 (5' – TTGTCCTTGCCTG(AG)CCGAT – 3') (Payne et al. 2005). A seguir, os isolados foram analisados por RFLP – PCR, com três enzimas de restrição: *Rsa* I, *Hinf* I e *Hae* III.

Em todas as análises, o polimorfismo foi avaliado, usando o software BIONumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA (unweighted pair – group with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

A análise das regiões repetitivas e conservadas do DNA, normalmente localizadas nos espaços intergênicos, pela amplificação com o “primer” BOX A1R – PCR detectou um nível de diversidade genética, pois praticamente cada estirpe apresentou um perfil único e, em um nível de similaridade de 70%, 99 perfis distintos foram obtidos (dados não mostrados). A análise de BOX – PCR detecta variabilidade entre estirpes e a diversidade genética elevada detectada neste estudo pode estar relacionada à adaptação às condições ambientais estressantes dos Cerrados, com temperaturas elevadas, longos períodos de estiagem, solos extremamente ácidos e pobres em nutrientes, entre outros.

Na análise por RFLP – PCR da região do gene ribossomal 16S, que indica variabilidade em nível de gênero/espécie, considerando o nível de similaridade de 70%, contabilizam-se sete espécies distintas. Houve predominância de uma espécie (Figura 1), bastante distinta das estirpes-tipo representativas das espécies de rizóbios que nodulam o feijoeiro. Mesmo em relação aos demais isolados dos Cerrados posicionados em outros agrupamentos, a similaridade genética com as estirpes-tipo foi baixa. Como o gene 16S rRNA tem sido considerado como referência para a taxonomia de bactérias (Garrity & Holt, 2001), esses resultados são um forte indicativo de novas espécies ainda não definidas de bactérias diazotróficas nos Cerrados. Outro gene que pode fornecer bastante informação sobre a posição taxonômica das bactérias é o *recA* (Payne et al., 2005). Na análise por RFLP – PCR dessa região gênica, também houve predomínio de uma espécie (Figura 2). Houve congruência elevada entre os genes 16S rRNA e *recA*. Na comparação com o banco de dados do Laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja, que contém mais de 400 rizóbios microssimbiontes de feijoeiro provenientes de áreas cultivadas dos Cerrados, os isolados deste estudo mostraram perfis distintos de BOX – PCR e de RFLP – PCR do 16S rRNA e de *recA*, indicando expressiva alteração genética na população com a entrada da agricultura.

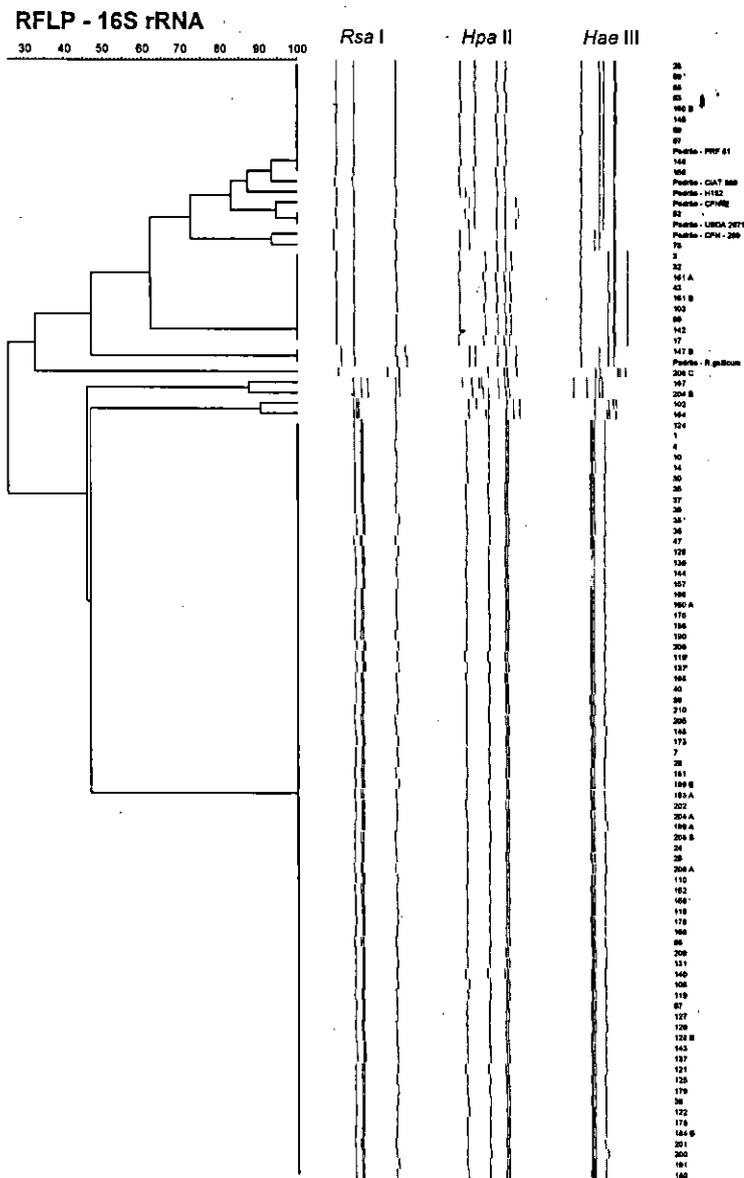


Figura 1. Agrupamento polifásico dos produtos de PCR-RFLP do gene 16S-rRNA com três enzimas de restrição dos rizóbios microsymbiontes do feijoeiro isolados de solos dos Cerrados.

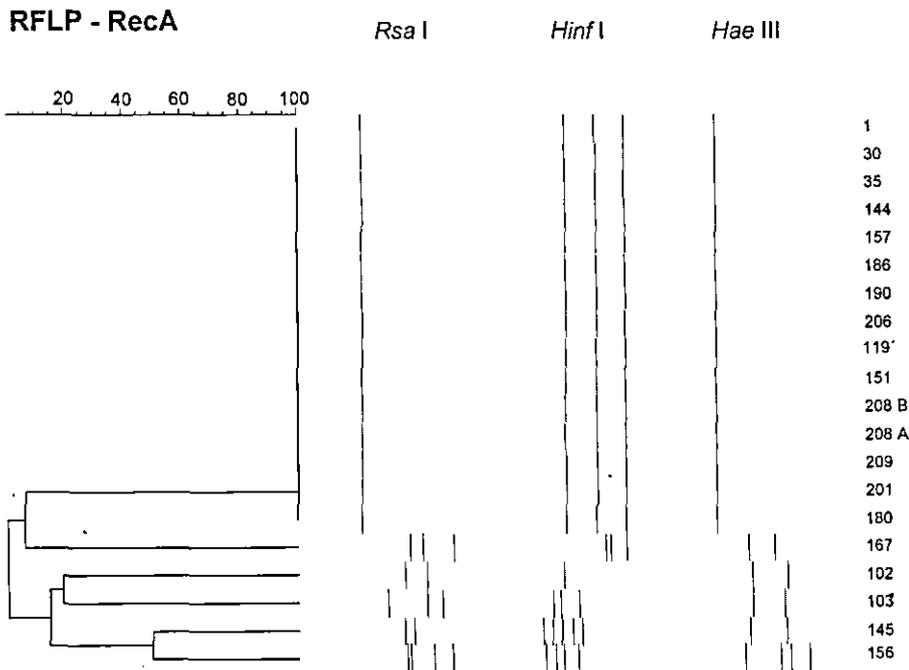


Figura 2. Agrupamento polifásico dos produtos de PCR-RFLP do gene *RecA* com três enzimas de restrição.

Considerações Finais

A diversidade genética elevada detectada neste estudo representa um forte indicativo de que muitas espécies de bactérias diazotróficas simbióticas nativas dos Cerrados ainda não foram descritas, ressaltando a necessidade de preservação de áreas ainda não cultivadas, pois essas bactérias podem representar uma fonte importante de genes para a agricultura e para o meio ambiente.

Referências

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of sys-**

tematic bacteriology, 2.ed. New York: The Williams & Wilkins: Springer - Verlag, 2001. v. 1, p. 119-154.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty – three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 210-220, 2006.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E.; Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire burkholderia genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, No. 7, p. 3917-3927, 2005.