

Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos dos cerrados

Fabio Plotegher¹; Iêda Carvalho Mendes²; Mariangela Hungria³. ¹Bolsista de IC do CNPq; ²Embrapa Cerrados; ³Embrapa Soja.

Introdução

O feijão é a base da alimentação de cerca de 300 milhões de pessoas, especialmente na América Latina e no sul e leste da África, sendo considerado, por alguns nutricionistas, um alimento perfeito, pois é fonte de proteínas, fibras e carboidratos complexos. Estima-se que, para mais de 100 milhões de consumidores pobres, cuja dieta é baseada em amido, essa leguminosa representa a única fonte protéica. O Brasil é, hoje, o segundo maior produtor mundial de *Phaseolus* e o primeiro produtor e consumidor de feijão, contudo, os rendimentos médios obtidos são bastante baixos, de apenas 826 kg/ha (CONAB, 2004). O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa. Para o estabelecimento de uma simbiose efetiva é necessário, porém, um maior conhecimento da diversidade dos rizóbios nativos capazes de nodular a leguminosa. Em estudos anteriores, foi constatada diversidade genética elevada de rizóbios nos Cerrados (Mostasso et al., 2002) e, dentro dessa diversidade, foi possível selecionar estirpes mais eficientes e competitivas (Hungria et al., 2003). Contudo, estudos mais abrangentes precisam ser conduzidos para um conhecimento mais preciso da diversidade de rizóbios nos Cerrados.

Objetivos

Caracterizar geneticamente rizóbios microssimbiontes de feijoeiro em áreas nativas dos Cerrados

Material e Métodos

Foram coletados nódulos de diversos locais nos Cerrados, nunca cultivados anteriormente. O DNA das bactérias foi extraído a partir de culturas puras de rizóbios em meio YMA, segundo procedimento otimizado (Kaschuk, 2003). O DNA foi amplificado pela técnica de PCR com o "primer" BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) e os seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 6 horas. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,00005%), observado em transluminador UV e fotografado. Essa técnica verificou a variabilidade genética em nível de estirpes. O polimorfismo foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

O DNA também foi amplificado com "primers" que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA: Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCGTGGCGGC-3') e Y3 (3'-CTGACCCCAACTTCAGCATTGTTCCAT-5'). Os produtos dessas ampliações foram submetidas à metodologia de RFLP-PCR (Laguerre et al., 1994), com as seguintes enzimas de restrição: *HaeIII*; *MspI* e *RsaI*. Os fragmentos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 3% e corridos em sistema de eletroforese a 120 V durante 4 horas. O polimorfismo também foi analisado usando o programa Bionumerics.

Resultados e Discussão

O nível de diversidade genética encontrado na análise de BOX A1R-PCR foi muito elevado, pois praticamente cada estirpe apresentou um perfil único (Fig. 1). Essa análise indica variabilidade entre estirpes, contudo, o grande número de perfis obtidos representa um forte indicativo de diversidade genética elevada, provavelmente com várias espécies novas, ainda não descritas.

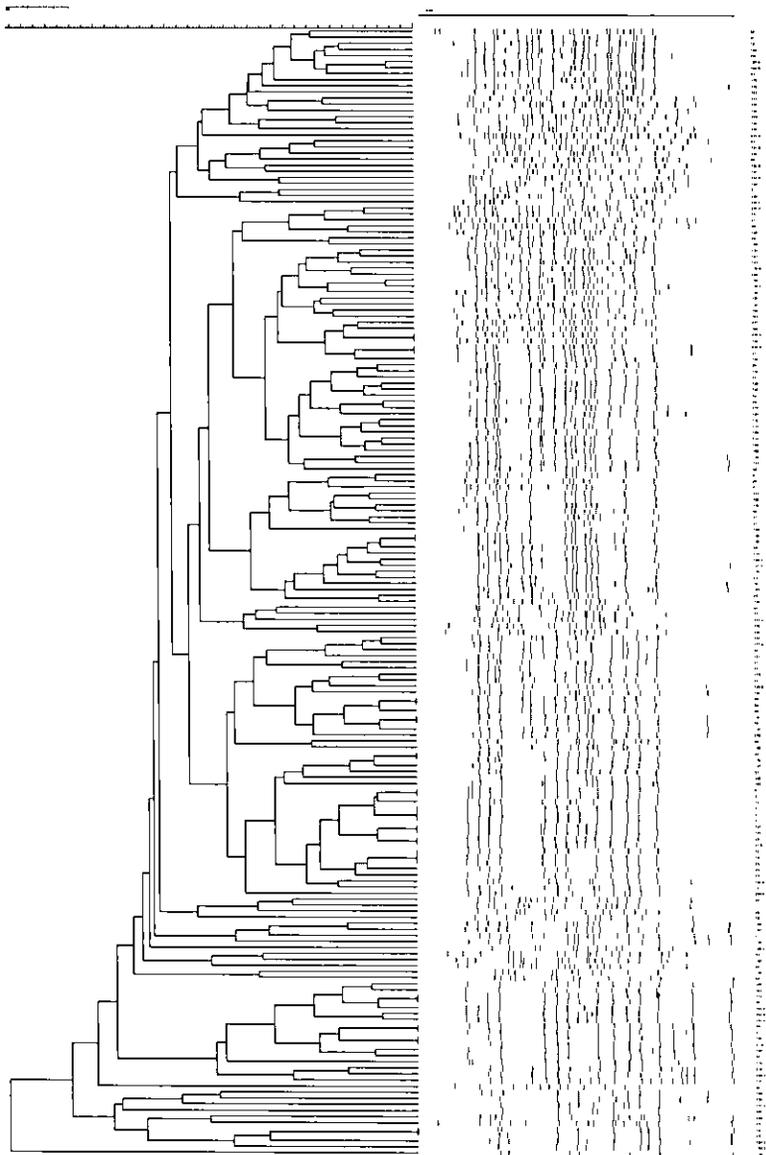


Figura 1. Análise de agrupamento dos produtos de DNA obtidos por BOX A1R-PCR de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de solos de Cerrados.

Na análise por RFLP-PCR da região do gene ribossomal 16S, houve indicação de predomínio de uma espécie (Fig. 2). Contudo, outras espécies foram observadas, diversas delas bastante distintas das estirpes-tipo usadas como referência, representando outro indicativo de novas espécies de rizóbios nos Cerrados.

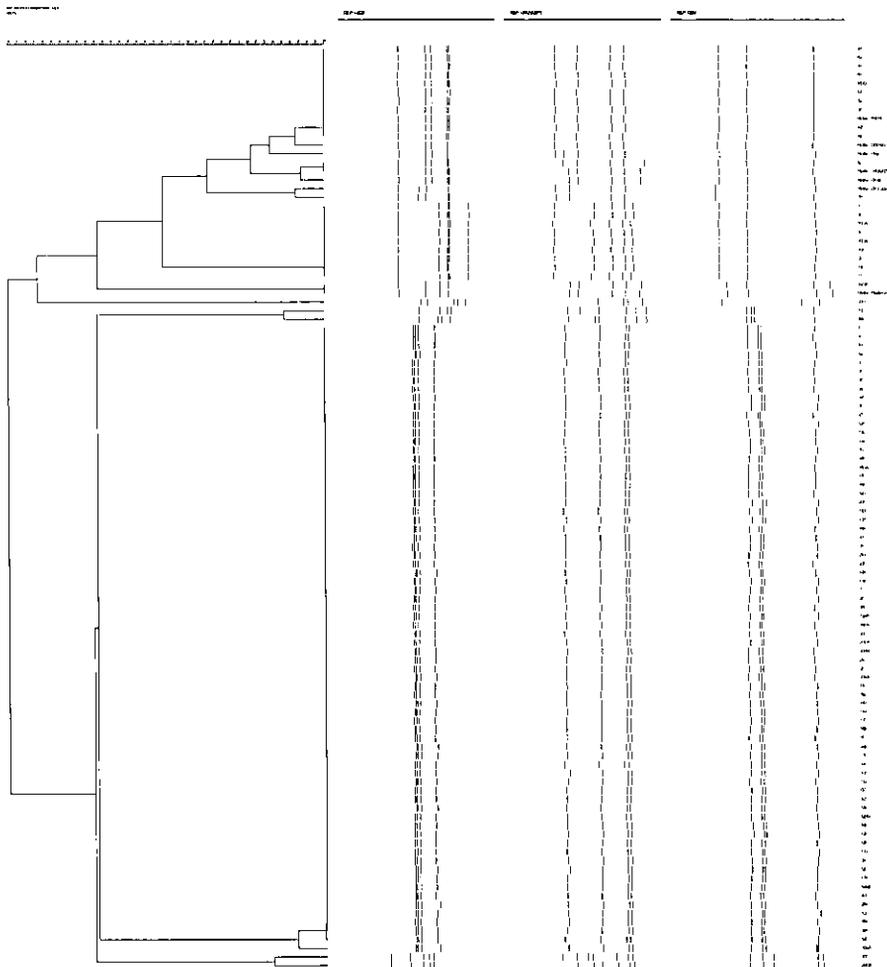


Figura 2. Análise de agrupamento dos produtos de DNA obtidos por RFLP-PCR de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de solos de Cerrados

Considerações Finais

A diversidade genética elevada observada em rizóbios microssimbiontes do feijoeiro é um forte indicativo de que muitas espécies de rizóbios dos solos tropicais ainda não foram descritas e que o patrimônio genético dos microrganismos em solos brasileiros precisa ser conhecido com mais detalhes, podendo representar uma fonte importante de genes de importância agrícola.

Agradecimentos

Projeto parcialmente financiado pelo CNPq (301241/2004-0).

Referências

- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Análise conjuntural de 2002**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 28 jan. 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.39, p. 88-93, 2003.
- KASCHUK, G. **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo**. 2003. 79 f. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- 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.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods of Molecular Cell Biology**, Oxford, v.5, p.25-40, 1994.