

Avaliação da diversidade genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* no estado de Roraima⁽¹⁾.

Eliane do Nascimento Cunha⁽²⁾; Patrícia Bombonati Chalita⁽³⁾; Jerri Édson Zilli⁽⁴⁾; Krisle da Silva⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa Projeto FBNPlus: 02.09.01.011.00.06.

⁽²⁾ Química, Técnica do Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR. E-mail: eliane.farias@embrapa.br; ⁽³⁾ Estudante de Biologia; Faculdade Cathedral, Rua Luís Canuto Chaves, 293, Caçari, CEP 69307-053, Boa Vista-RR, patichalita@hotmail.com;

⁽⁴⁾ Pesquisador em Microbiologia do Solo; Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465 Km 7, CEP 23890-000, Seropédica-RJ. E-mail: jerri.zilli@embrapa.br. ⁽⁵⁾ Pesquisadora em Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR; E-mail: krisle.silva@embrapa.br.

RESUMO: A fixação biológica de nitrogênio é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, que são denominados diazotróficos. A caracterização fenotípica e genotípica de bactérias é um processo inicial para identificação, e um indicativo de diversidade destes organismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* no estado de Roraima. A caracterização fenotípica foi realizada através da caracterização morfológica cultural em meio Dyg's sólido. A caracterização genotípica foi avaliada através da análise de ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) de 29 bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria* cultivadas em área de cerrado e em área de transição cerrado-mata. Foram utilizadas quatro enzimas de restrição (*Rsal*, *HaeIII*, *HhaI* e *MspI*). Além das amostras, foram incluídas três estirpes de referências, a BR 11001 (*Azospirillum brasiliense*); BR11192 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e BR1136 (*Burkholderia tropica*). Foi verificada uma elevada diversidade genotípica entre as bactérias diazotróficas, porém nenhuma bactéria apresentou características similares às estirpes de referência de *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, indicando a existência de outros gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de braquiária em Roraima.

Termos de indexação: Fixação biológica de nitrogênio; braquiária; ARDRA.

INTRODUÇÃO

Espécies de *Brachiaria* possuem papel importante nas pastagens brasileiras. No Brasil, a bovinocultura de corte é fortemente sustentada por diferentes espécies do gênero *Brachiaria*, tornando-as principal fonte de nutrientes para animais em

pastejo. Neste contexto, enfatiza-se a importância dos conceitos de valor nutritivo e de valor alimentício das forrageiras. Esta gramínea viabilizou a pecuária de corte nos solos ácidos e de baixa fertilidade, principalmente em áreas de Cerrados (Corrêa & Santos, 2003). No entanto, muitas das áreas de pastagem brasileiras encontram-se degradadas, principalmente pela falta de manutenção da fertilidade do solo, sendo o nitrogênio um dos nutrientes mais limitantes (Oliveira et al., 1997).

As espécies de *Brachiaria* podem se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da associação com bactérias diazotróficas.

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como o ácido indol acético, entre outros. Assim, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV); e assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, entre outras, são a principal fonte de carboidrato da dieta humana e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de FBN, mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção o que justifica estudos visando seu manejo. No entanto, os sistemas agrícolas atuais são na maioria dependentes de insumos industrializados (como adubos nitrogenados) e não exploram o grande potencial dos diazotróficos, tanto para a FBN quanto para outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal (Moreira et al., 2010).

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade, pela sua distribuição no ambiente, e sua interação com diferentes genótipos vegetais.

Para caracterização genotípica de bactérias, a técnica conhecida como ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal) é uma ferramenta útil e rápida para análise da diversidade (Grifoni et al., 1995). Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais que sofrem poucas influências por mudanças no meio ambiente.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicula* no estado de Roraima.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das bactérias

As 29 bactérias caracterizadas neste estudo foram obtidas a partir de duas espécies de Braquiária. Em área de cerrado, no Campo Experimental Água Boa da Embrapa Roraima foram isoladas as bactérias ERR 525, ERR 526, ERR 527, ERR 528, ERR 529, ERR 530 das raízes de plantas de *Brachiaria humidicula* (N 02°39'51,7", W 60°50'60,5"). Na mesma área, as bactérias ERR 539, ERR 540, ERR 541 foram isoladas da parte aérea de plantas de *Brachiaria brizantha* (N02°39'34,7", W 60°50'00,8"), e ERR 531, ERR 532, ERR 533, ERR 534 das raízes. Em área de transição cerrado-mata, na Fazenda São Paulo, foram isoladas ERR 535, ERR 536 da parte aérea de plantas de *Brachiaria humidicula* (N02°18'05,5", W 61°15'32,9") e ERR 513, ERR 514, ERR 515, ERR 516, ERR 517 das raízes. De plantas de *Brachiaria brizantha* (N02°17'34,4", W 61°15'09,8") foram isoladas as bactérias ERR 537, ERR 538 da parte aérea e ERR 518, ERR 519, ERR 520, ERR 521, ERR 522, ERR 523, ERR 524 das raízes.

Caracterização morfológica cultural

A caracterização morfológica foi realizada a partir do aparecimento de no mínimo 3 colônias isoladas em meio de cultura sólido Dgys (Rodrigues Neto et al., 1986) incubadas em BOD a 29° C. As características avaliadas foram: manifestação de crescimento (muito rápida: 1 dia, rápida: 2 a 3 dias, intermediária: 4 a 5 dias, lento: 6 a 9 dias, muito lento: superior a 10 dias), diâmetro das colônias (mm), forma (puntiforme, circular ou irregular), elevação das colônias (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante), borda (inteira ou irregular), superfície da colônia (lisa ou rugosa), produção de muco (escassa, pouco, moderada e abundante), transparência (opaca, transparente e translúcida), muco (homogêneo ou heterogêneo). Além das

bactérias isoladas, foram incluídas seis estirpes de referência, a BR 11001 (*Azospirillum brasiliense*); BR 11192 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR 11175 (*Herbaspirillum seropedica*), BR 11140 (*Azospirillum amazonense*) e BR 11360 (*Burkholderia tropica*).

As características foram comparadas e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jaccard. As bactérias foram agrupadas pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1t).

Extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA

Para a extração do DNA, as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio estéril contendo meio líquido Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) e levadas a incubadora do tipo shake por 24 horas a 29° C 120 RPM. Posteriormente, uma alíquota 1,0 mL dessa cultura foi centrifugada a 13.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspenso em 1,0 mL de água ultra pura estéril, homogeneizado em agitador tipo vortex, e mais uma vez centrifugado. Sendo esse último procedimento repetido três vezes. Após a última lavagem o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de NaOH (0,5N) ficando em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos para a completa lise das células. Em seguida, 10 µL do material lisado foram coletados e diluídos em 490 µL de solução de Tris-HCl 20 mM, pH 8.

Para a caracterização genotípica o gene 16s rRNA das bactérias foi amplificado utilizando os iniciadores Y1 (TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC) e B3 (TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG TC). Para 50 µl de reação foram utilizados: 2,0 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 0,12 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq DNA polimerase.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95°C por 2 min), 30 ciclos de desnaturação (93°C por 45 s), anelamento (62°C por 45 s), extensão (72°C por 2 min) e uma extensão final (72°C por 5 min).

Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

As amostras amplificadas foram clivadas em quatro enzimas de restrição, *HhaI*, *HaeIII*, *RsaI* e *MspI*. As condições para essa reação de 10 µl foram: 5U da enzima; 1,0 µl de tampão da enzima e 6,0 µl do produto do gene 16S DNA amplificado. As

reações foram incubadas em termomix a 37° C por 12 horas. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose (3%) a 120 V por 4 horas. Além das amostras, foram incluídas três estirpes de referências, a BR 11001 (*Azospirillum brasilense*); BR 11192 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e BR 11366 (*Burkholderia tropica*). A visualização dos fragmentos foi realizada através da coloração com Gel Red sob iluminação ultravioleta, e fotografadas em sistema de foto documentação UVP.

Os perfis de restrição foram analisados e suas similaridades estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson e agrupadas pelo método UPGMA (average linkage clustering) utilizando o programa Bionumerics versão 6.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que das 29 bactérias isoladas 83% apresentaram crescimento muito rápido, 14% rápido e 4% intermediário. Quanto à forma da colônia 69% apresentaram forma circular, 28% irregular e 4% puntiforme. Os tamanhos iniciais entre as colônias dos 29 isolados variavam de ≤ 1 a 6 mm e o tamanho final variou de 1 a 10 mm. A elevação das colônias 76% apresentaram elevação plana, 17% lenticulada, 4% convexa e umbonada. As variações quanto à superfície das colônias foram de 76% lisa e 24% rugosa. A partir dos dados da caracterização morfológica cultural, foi gerado um dendrograma (**Figura 1**). A partir da análise do dendrograma, foi possível observar a formação de 22 grupos morfológicos culturais compartilhando 70% de similaridade em suas características. Apenas duas bactérias apresentaram todas as características similares entre si (ERR 524 e ERR 525). Duas bactérias se agruparam a *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR 11192, ERR 516 e ERR 538. Uma bactéria se agrupou a estirpe de *Azospirillum brasilense* BR 11001.

A restrição do gene 16S rRNA das 29 bactérias isoladas com as 4 enzimas de corte utilizadas (*RsaI*, *HaeIII*, *HhaI* e *MspI*) são apresentadas na **Figura 2**. Analisando os perfis com 70% de similaridade, há formação de 19 grupos, sendo que nenhum desses se agrupa com as estirpes de referências. Os gêneros encontrados na literatura isolados a partir de plantas de braquiárias são o *Azospirillum* (Magalhães & Dobereiner, 1984; Lange & Moreira, 2002; Reis Júnior et al., 2004) e *Herbaspirillum* (Baldani et al., 1992). Os resultados deste trabalho indicam elevada diversidade entre as bactérias obtidas, pois poucas bactérias se agruparam com as estirpes de referência e podem representar outros gêneros de diazotróficos ainda

não relatados quanto sua associação com plantas de braquiárias.

CONCLUSÕES

Existe uma grande diversidade fenotípica e genotípica entre as bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria*.

Nenhuma das bactérias isoladas foi similar genotipicamente aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

REFERÊNCIAS

BALDANI, V.L.D. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65-73, 1992.

CORREIA, L.A. & SANTOS, P.M. Manejo e utilização de plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon*. São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste, 2003. 36p. (Documentos 34).

GRIFONI, A. et al. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microb. Lett.*, 127:85-91, 1995.

LANGE, A. & MOREIRA, F.M.S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de *Orchidaceae* e de outras famílias vegetais. *R. Bras. Ci. do Solo*, 26: 529-533, 2002.

MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia*, 15: 246-252, 1984.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1: 74-99, 2010.

OLIVEIRA, E. Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1992. 96 p. (Dissertação de Mestrado).

REIS JÚNIOR, F.B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Ci. Solo*, 28: 103-113, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR. O Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. *Summa Phytopathologica*. Campinas, 12:16, 1986.

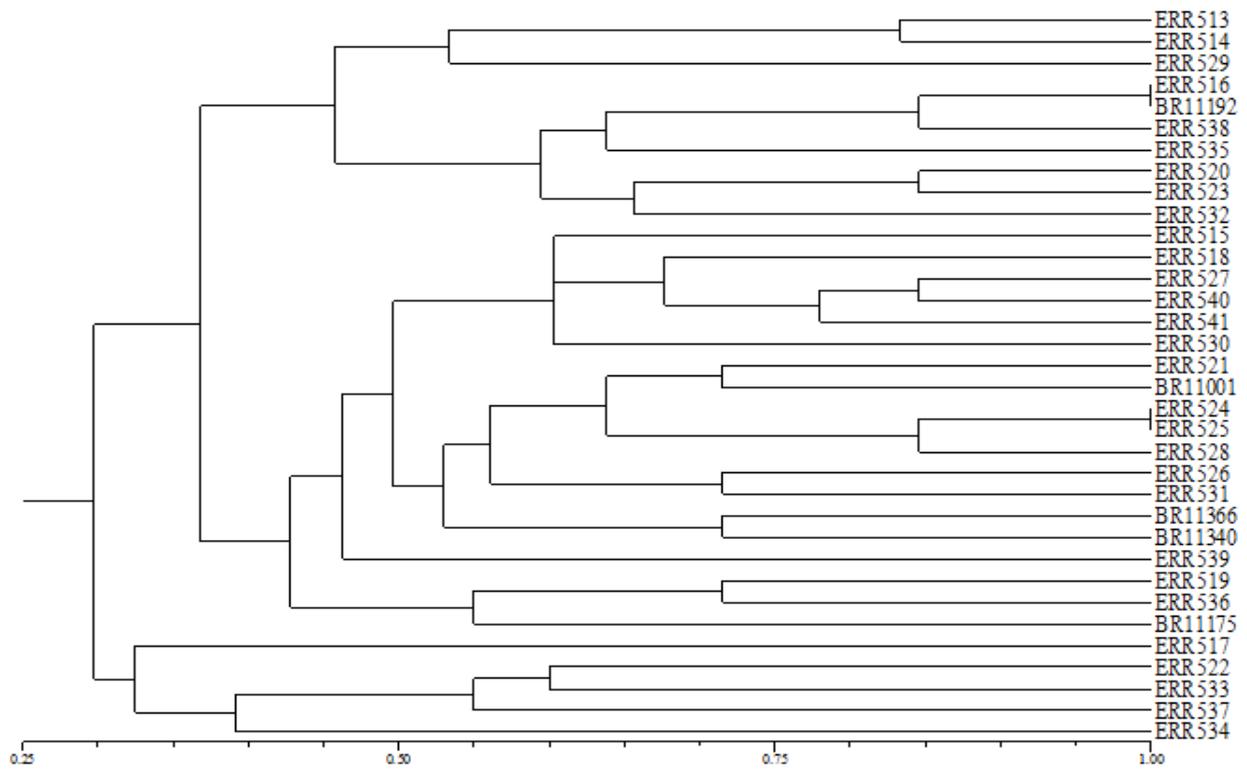


Figura 1: Dendrograma de morfológico cultural de similaridades das 29 bactérias isoladas de plantas de braquiária de áreas de cerrado e mata em Roraima.

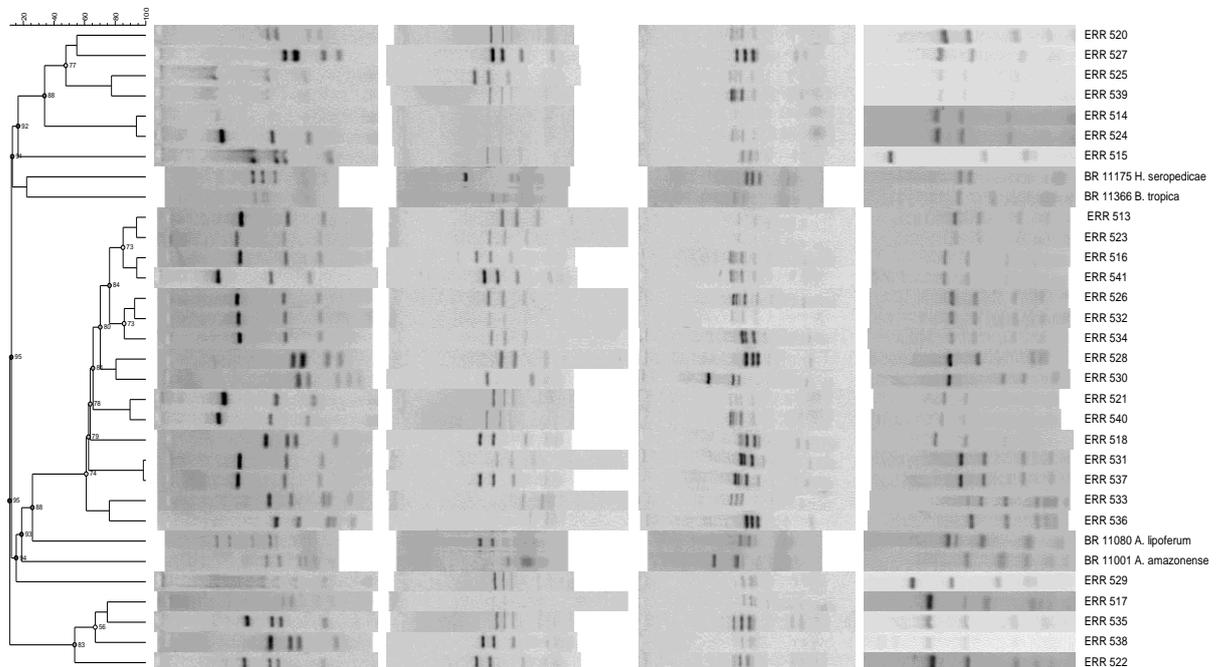


Figura 2: Dendrograma de similaridade de perfil das enzimas de restrição *RsaI*, *HaeIII*, *HhaI* e *MspI* dos 29 bactérias isoladas de braquiária junto com as e estirpes referência (BR 11001; BR 11080; BR 11175 e BR 11360).