

Caracterização genotípica de bactérias isoladas de pau-rainha.

Ismaele Breckenfeld da Costa⁽¹⁾; Eliane do Nascimento Cunha⁽²⁾; Alexandre Cardoso Baraúna⁽³⁾; Jerri Édson Zilli⁽⁵⁾; Krisle da Silva⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa Projeto FBNplus 02.09.01.011.00.06

⁽²⁾ Aluna de graduação em Agronomia da Faculdade Roraimense de Ensino Superior; São Pedro, Av: Juscelino Kubitschek, n° 300, Boa Vista RR; ismaelebreckenfeld@hotmail.com; ⁽³⁾ Assistente de Laboratório; Laboratório de Microbiologia; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174 Km8, CEP 69301-970, Caixa Postal 133, Boa Vista RR; eliane.farias@embrapa.br; ⁽⁴⁾ Aluno de Doutorado; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Programa Ciência do Solo, BR 465, Km 7 - Seropédica, CEP 23890-000, Rio de Janeiro, alexandre.barauna.bio@gmail.com; ⁽⁵⁾ Pesquisador microbiologia do solo; Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7 caixa postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica-RJ; jerri.zilli@embrapa.br; ⁽⁶⁾ Pesquisadora em microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR; krisle.silva@embrapa.br.

RESUMO - O pau rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) é uma leguminosa arbórea que ocorre em ilhas de mata em savanas no Estado de Roraima. Esta espécie se beneficia do processo de fixação biológica de nitrogênio através da simbiose com bactérias do grupo rizóbio. Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade genotípica dos rizóbios em simbiose com esta leguminosa. Portanto, o objetivo desde trabalho foi avaliar a diversidade genotípica de uma coleção de bactérias isoladas de pau rainha em Roraima. A caracterização foi realizada em 75 bactérias através da análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) utilizando a enzima *Hha* I. Entre as 75 bactérias, 19 já haviam sido identificadas e foram utilizadas como referência. As 75 bactérias formaram dez perfis distintos, sendo que destes, apenas um não se agrupou com as bactérias utilizadas como referência. Os resultados indicam a predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Termos de indexação: *Centrolobium paraense* Tul.; fixação biológica de nitrogênio; ARDRA.

INTRODUÇÃO

O pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) ocorre naturalmente desde o Panamá, em direção ao Sul, passando pelo Equador, Venezuela, Colômbia, Guianas, Suriname, até o norte do Brasil (Dahmer et al., 2009). No Brasil é frequentemente encontrada no Estado de Roraima. Trata-se de uma leguminosa da subfamília Papilionoideae que estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Esta planta é adaptada às condições de baixa pluviosidade e é frequentemente encontrada em bordas de florestas semi-decíduas (ilhas de mata) e em florestas de transição, atuando como plantas pioneiras (Kaminski, 2004).

Além da importância ecológica, o pau-rainha possui um alto potencial madeireiro e é geralmente utilizada na construção de moradias indígenas, na

construção de móveis, como combustível, para fins medicinais e para extração de corante (Kaminski, 2004; Pedreira et al., 2010). Recentemente foram isoladas 178 bactérias de pau-rainha em Roraima (Baraúna, 2013). Destas, 26 foram caracterizadas através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, sendo identificados como pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pleomorphomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Baraúna, 2013). No entanto, é necessária a caracterização das demais bactérias.

Portanto o objetivo desde trabalho foi avaliar a diversidade genotípica de uma coleção de bactérias isoladas de pau-rainha em Roraima.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das bactérias

Foram utilizadas 75 bactérias isoladas de pau-rainha por Baraúna (2013). Destas, 19 foram identificadas por Baraúna como pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pleomorphomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Amplificação do gene de 16S rRNA

Para amplificação, foi realizada a lise de células através da fervura em água ultrapura das colônias das bactérias cultivadas em meio 79 sólido (Fred & Waskman, 1928). 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, 1U de Taq DNA polimerase e 10 µl da solução contendo as células bacterianas lisadas.

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 de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

O produto amplificado foi clivado com uma enzima de restrição, *Hha* I. As condições para uma reação de 10 µl foram: 5U da enzima; 1,0 µl de tampão da enzima e 6 µl do produto gene 16S rDNA amplificado. A reação foi incubada por 37°C por 12 horas. Os fragmentos foram analisados em gel agarose (3%) a 120 V por 4 horas. A visualização dos fragmentos foi realizada através da coloração do *Gel Red*, e fotografadas em sistema de fotodocumentação UVP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se uma grande diversidade genotípica entre as bactérias do pau rainha, formando dez grupos com perfis diferentes. A distribuição das bactérias entre os diferentes estão apresentados na **tabela 1**. O perfil de cada grupo é apresentado na **figura 1**.

Ao comparar estes grupos com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA realizado por Baraúna (2013), foi possível observar que os grupos I ao VI foram representados por poucos bactérias (uma ou duas) e que todas já haviam sido previamente identificadas. É possível observar quatro perfis distintos de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (**Tabela 1**), os perfis VI, VII, VIII e IX.

O último perfil, X, foi composto por oito bactérias que são similares entre si, mas não possuem semelhança com nenhum dos gêneros pertencentes aos perfis avaliados.

Das 75 bactérias, 57 são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (**Tabela 1**), indicando haver predominância deste gênero capaz de estabelecer simbiose com pau-rainha. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Baraúna (2013), que de 26 bactérias sequenciadas encontraram 14 pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Estes resultados indicam uma diversidade de bactérias em simbiose com pau-rainha. Esta diversidade ocorre principalmente entre espécies diferentes de *Bradyrhizobium*.

O perfil X deverá ter seu gene 16S rRNA sequenciado para a identificação do gênero.

CONCLUSÕES

Existe uma grande diversidade genotípica entre as bactérias isoladas de pau-rainha.

Há predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

REFERÊNCIAS

BARAÚNA, C. A. Diversidade e eficiência simbiótica e estirpes de rizóbios isolados de nódulos de pau-rainha (*Centolobium paraense* Tul.). Boa Vista, Universidade Federal de Roraima, 2013. 93p. (Dissertação de mestrado)

DAHMER, N.; WITTMANN S. M. T.; KAMINSKI, P. E. Chromosome number and karyotype of the endangered Amazonian woody *Centrolobium paraense* Tul. *Species. Crop breeding and applied biotechnology*, 9: 382-385 2009.

FRED, E. B. & WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book, 1928. 143p.

KAMINSKI, P. E. O pau-rainha (*Centrolobium paraense*): características, potencialidades e usos. Roraima, Embrapa Roraima, 2004. 31p. (Documentos 10).

PEDREIRA, J. L.; MILLER, R. P.; PINHO, R. C. de; ALFAIA, S. Manejo da rebrota de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul – Leguminosae) nas roças e capoeiras da comunidade Mutamba, Terra Indígena Araçá, Roraima. Disponível em: www.sct.embrapa.br/cdagro/tema01/01tema22.pdf. Acesso em: 17 maio 2010.

VALE JÚNIOR, J.F. & SCHAEFER, C.E.G.R. Solos sob savanas de Roraima – gênese, classificação e relações ambientais. Boa Vista, Gráfica Ioris, 2010. 219p.

Tabela 1. Perfil de ARDRA obtido de 75 bactérias isoladas de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) em Roraima.

Perfil	Bactérias	Identificação
I	ERR 333*	<i>Klebsiella</i>
II	ERR 383*	<i>Enterobacter</i>
III	ERR 344*, ERR 308*	<i>Pleomorphomonas</i>
IV	ERR 377*, ERR 380*	<i>Rhizobium</i>
V	ERR 469*, ERR 312*	<i>Burkholderia</i>
VI	ERR 417*, ERR 421*	<i>Bradyrhizobium</i>
VII	ERR 314*, ERR 414, ERR 427, ERR 426, ERR 368, ERR 459, ERR 431, ERR 298*, ERR 455, ERR 341, ERR 299*, ERR 437, ERR 305*, ERR 441, ERR 425, ERR 423, ERR 433, ERR 434, ERR 416, ERR 424, ERR 407, ERR 411, ERR 465, ERR 419, ERR 372*	<i>Bradyrhizobium</i>
VIII	ERR 387, ERR 313*, ERR 367, ERR 404, ERR 403, ERR 398, ERR 370 ERR 384, ERR 297, ERR 388, ERR 352, ERR 351, ERR 346, ERR 347, ERR 364, ERR 338, ERR 337, ERR 391, ERR 348, ERR 373, ERR 458, ERR 369, ERR 412, ERR 371, ERR 422, ERR 382, ERR 389, ERR 354, ERR 359	<i>Bradyrhizobium</i>
IX	ERR 412*, ERR 326*, ERR 329*	<i>Bradyrhizobium</i>
X	ERR 443, ERR 428, ERR 454, ERR 410, ERR 444, ERR 439, ERR 404, ERR 409	-

*Bactérias previamente identificadas por Baraúna (2013).

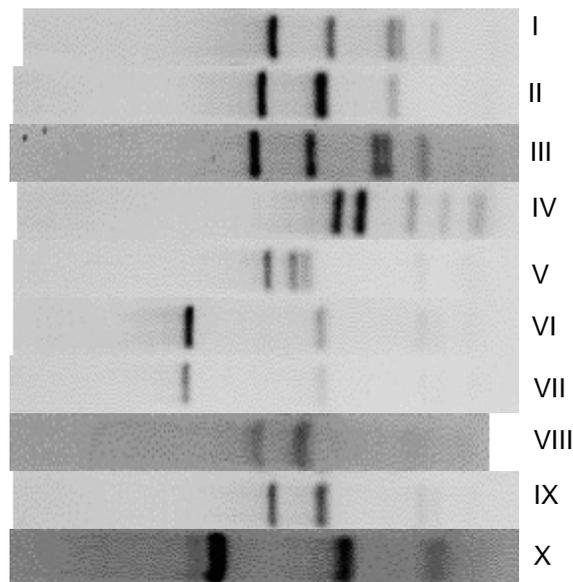


Figura 1. Perfis de ARDRA das bactérias isoladas de pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) em Roraima.