

Variabilidade Genética de Novas Bactérias Nodulando *Erythrina velutina* Willd.

Genetic Variability of New Bacteria Nodulating *Erythrina velutina* Willd

*Layane Silva Barbosa de Souza*¹; *Kelly Alexandra Souza Menezes*²; *Islane Andrade Nunes*¹; *Camila Campos Barros de Souza*¹; *Sirando Lima Seido*³; *Carlos Alberto Tuão Gava*⁴; *Lindete Míria Vieira Martins*⁵; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*⁶

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de novas bactérias nodulantes de mulungu por meio da técnica de Box-PCR. Foram utilizadas oito bactérias isoladas do mulungu, nativas de solos do Semiárido e cinco estirpes de rizóbio de referência. As bactérias foram cultivadas em meio YM, em tempo adequado para cada isolado, e a extração do DNA foi realizada com kit comercial. Para a reação de Box-PCR, foi utilizado o iniciador Box-A1. Após a reação, o produto do PCR foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose e visualizado em luz UV. A imagem do gel foi utilizada para

¹Estudante de Biologia, estagiária da Embrapa Semiárido, Universidade Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

²Bióloga, aluna do curso de pós-graduação em Horticultura Irrigada, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

³Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em Horticultura Irrigada, Bolsista BFT Facepe, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴ Engenheiro-agrônomo, D. Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciência do Solo, Professora Adjunta, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

⁶Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

a construção do dendrograma de similaridade. Todas as bactérias avaliadas apresentaram similaridade ao redor de 45%. Sete subgrupos foram formados, dos quais cinco compostos exclusivamente por rizóbios de mulungu. Dentre as bactérias isoladas de mulungu, a que apresentou maior similaridade com algumas das estirpes de referência foi o isolado M42-4, com similaridade aproximada de 77% com a estirpe padrão BR 322 de *Rhizobium tropici*. A baixa similaridade entre as bactérias estudadas e as estirpes de referência indica a presença de grupos taxonômicos novos dentre as novas bactérias estudadas.

Palavras-chave: mulungu, rizóbio, fixação biológica de nitrogênio, biodiversidade, Caatinga.

Introdução

As bactérias formadoras de nódulos em leguminosas, chamadas coletivamente de rizóbios, são micro-organismos benéficos que se associam ao sistema radicular e/ou caulinar de leguminosas e são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, fornecendo-os às plantas hospedeiras (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa associação tem sido explorada na agricultura e silvicultura por meio da utilização de inoculantes contendo bactérias selecionadas e de eficiência agronômica reconhecida.

Para a obtenção de bactérias eficientes e competitivas, um longo trabalho de isolamento e caracterização destes rizóbios tem sido conduzido para diversas espécies no Brasil. Apesar do enfoque dessas pesquisas ser a avaliação da eficiência agronômica dos isolados, no processo de seleção, a avaliação da diversidade das bactérias obtidas é fundamental, pois permite o posicionamento taxonômico adequado dos isolados, o que possibilita determinar estratégias para os seus processos de utilização em inoculantes comerciais. Poucos são os resultados de pesquisa avaliando a diversidade de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas conduzidos no Semiárido. Porém, os dados disponíveis para espécies da subfamília Mimosoidae indicam a existência de bactérias pertencentes a grupos taxonômicos ainda não descritos e encontrados na região (TEIXEIRA et al., 2010).

O mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) é uma leguminosa arbórea pertencente à subfamília Papilionoidae, tribo Phaseolae. Na região Nordeste, essa espécie nativa apresenta diversos usos, tais como, na medicina popular e como fonte de madeira (QUEIROZ, 2009). Para potencializar o seu uso e para a produção de mudas mais sadias e vigorosas, a utilização de rizóbios pré-selecionados pode ser uma estratégia. Entretanto, não há, na literatura, registros sobre a obtenção e caracterização de rizóbios para essa espécie, tornando a seleção de rizóbios para mulungu um tema de pesquisa relevante e urgente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de oito rizóbios pré-selecionados para o mulungu por meio da técnica de Box-PCR.

Material e Métodos

As bactérias associadas ao mulungu foram previamente isoladas, caracterizadas fenotipicamente e tiveram a sua capacidade de re-nodular o hospedeiro previamente avaliada por Menezes (2013). Como bactérias de referência, foram usadas as espécies *Rhizobium tropici* (BR 322), *Bradyrhizobium* sp. (BR 5609), *Ensifer fredii* (BR 4007) e *Burkholderia sabiae* (BR 3405 e BR 3407). As estirpes de referência foram cedidas pela Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

Para a extração de DNA, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura YM (VINCENT, 1970) sem indicador de pH por 3 dias, para as bactérias de crescimento rápido, e 7 dias, para as bactérias de crescimento lento. O DNA foi extraído com kit comercial, seguindo-se as instruções do fabricante, e armazenado em freezer a -20 °C.

Na reação de Box-PCR, o iniciador Box A1 (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) foi utilizado, conforme Versalovic et al. (1994). A reação de PCR foi dimensionada para 25 μ L com tampão de reação (1x), $MgCl_2$ (3 mM), dNTPs (1,5 μ M de cada base), 2 μ M do iniciador e Taq DNA Polimerase (1,25 U), além de, aproximadamente, 50 ng (1 μ L) do DNA genômico. A programação térmica da reação constituiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 8 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 53 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos, sendo finalizada com uma extensão final por 16 minutos (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013; HUNGRIA et al., 2008).

O produto de PCR foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (p/v), a 120 V, por 6 horas. O gel foi corado em solução

de brometo de etídeo (0,05% v/v) e visualizado em sistema de fotodocumentação com luz UV. A imagem do gel foi analisada, utilizando-se o programa Bionumerics versão 7.0. Para a construção do dendrograma de similaridade, foi utilizado o coeficiente de Pearson, com o método de agrupamento UPGMA.

Resultados e Discussão

O agrupamento no dendrograma de similaridade mostrou que todas as bactérias isoladas do mulungu e as estirpes de referência apresentaram em torno de 45% de similaridade (Figura 1).

Avaliando-se a similaridade de 65 %, é possível observar a formação de sete grupos distintos. O grupo I apresenta o isolado M42-2 e as estirpes de *R. tropici* e *Bradyrhizobium* sp. O grupo II englobou os isolados M33-4 e M31-5; enquanto o grupo III foi formado apenas por estirpes de referência; sendo duas de *Burkholderia sabiae* e a de *Ensifer fredii*. Assim como o grupo II, o grupo V também foi formado por apenas dois isolados bacterianos obtidos de mulungu (M83-2 e M83-3). Cada um dos grupos IV, VI e VII foram formados por apenas uma bactéria isolada do mulungu.

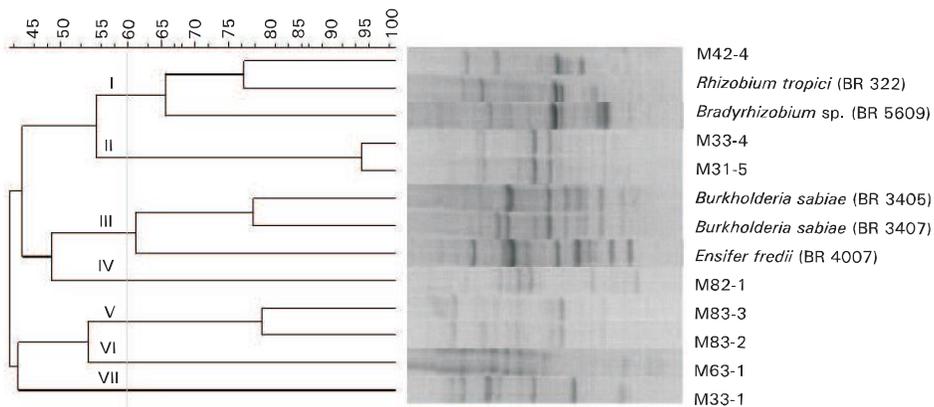


Figura 1. Dendrograma de similaridade entre oito bactérias nodulantes isoladas de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) e cinco estirpes de rizóbio de referência, elaborado a partir do perfil de bandas geradas pela técnica de Box-PCR (coeficiente de Pearson e método de agrupamento UPGMA).

A baixa similaridade genética das bactérias isoladas de mulungu com as estirpes de referência indicam a elevada diversidade de rizóbios presentes em solos do Semiárido e que são capazes de nodular essa planta.

Neste trabalho, o isolado que apresentou maior similaridade com alguma estirpe de referência foi o M42-4, com cerca de 77% em relação à estirpe BR 322 de *R. tropici*. No trabalho de seleção destes rizóbios para mulungu, Menezes (2013) verificou a existência de grande variabilidade fenotípica na coleção de rizóbio obtida. Esta variabilidade também foi observada em relação à genética, ao se acessar a variabilidade genética dos isolados por meio da técnica de Box-PCR na realização deste trabalho.

A técnica de Box-PCR, de fácil execução e de baixo custo, tem sido utilizada, recentemente, em diversos estudos para avaliar a variabilidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio em espécies nativas e cultivadas (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013; LYRA et al., 2013). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que esta técnica foi eficiente para a avaliação da variabilidade genética das novas bactérias do mulungu entre si e com as estirpes de referência.

Conclusão

Os isolados de rizóbio de mulungu apresentaram elevada variabilidade genética e baixa similaridade com as estirpes de rizóbio de referência utilizadas.

Referências

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PEREIRA, G. M. D.; PERIN, L.; SILVA, L. M.; BARAÚNA, A. C.; ALVES, F. M.; PASSOS, S. R.; ZILLI, J. E. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 61, p. 991-999, 2013.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 290).

LYRA M. C. C. P.; FREITAS A. D. S.; SILVA T. A.; SANTOS C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 12, p. 2147-2156, 2013.

MENEZES, K. A. S. **Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas cultivadas em solos do Semiárido**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 467 p.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 201-208, 2010.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J. de; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.