

Caracterização genética de rizóbios tolerantes à acidez e ao alumínio, nativos de solos da Amazônia, como subsídio para estudos de ecologia da fixação biológica do N₂.

Francisco Adilson dos Santos Hara⁽¹⁾, Luiz Antônio de Oliveira⁽²⁾, Mariangela Hungria⁽³⁾, Magda Cristiani Ferreira⁽³⁾. ⁽¹⁾Prof. Dr. DEAS/FCA/Universidade Federal do Amazonas (fhara@ufam.edu.br), ⁽²⁾CPCA/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, ⁽³⁾Embrapa Soja (hungria@cnpso.embrapa.br).

Introdução

A caracterização genética de microrganismos é de extrema importância para estudos taxonômicos e para conhecer melhor suas características fisiológicas, ecológicas e econômicas. Esta prática é uma ferramenta fundamental para o estudo da ecologia de microrganismos do solo, pois permite o conhecimento de sua diversidade. Aspectos práticos podem ser elucidados pelo estudo da caracterização genética de microrganismos do solo, como é caso do efeito do manejo do solo (Ferreira *et al.*, 2000) e da aplicação de herbicidas (Barbosa *et al.*, 2001) sobre a diversidade dos mesmos. Outro aspecto importante é que a caracterização de isolados de rizóbios nativos do solo é condição essencial para o desenvolvimento de estudos de competitividade que indicarão a possibilidade de sucesso de inoculação das leguminosas. O conhecimento da ecologia dos isolados de rizóbio presentes nos solos das regiões tropicais é ainda bastante restrito (Sá & Vargas, 1997), principalmente na Amazônia, onde poucos estudos sobre ecologia e genética microbiana têm sido desenvolvidos. Sendo assim, a utilização de técnicas de biologia molecular poderá aumentar não só o conhecimento sobre a diversidade de rizóbios em solos tropicais, como também ajudar nos estudos de competitividade e determinação da persistência dos isolados inoculados no campo.

Objetivos

Realizar a caracterização genética de isolados de rizóbios tolerantes à acidez e ao alumínio tóxico e compará-los com estirpes de rizóbios utilizadas em inoculantes comerciais.

Material e Métodos

A fase inicial do trabalho, correspondendo aos testes de tolerância à acidez e ao Al tóxico, foi realizada no laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Em condições de placa de Petri, foram realizados vários testes com diferentes isolados do Banco de Germoplasma de Rizóbio do INPA. As condições de crescimento analisadas foram pH 4,5; pH 4,5 + 2 cmol_c Al/L de meio; e pH 6,5. Foi utilizado o método de riscagem em placas com quatro zonas de crescimento, proposto por Oliveira & Magalhães (1999). Após a avaliação, os isolados tolerantes ao alumínio e à acidez foram selecionados para a análise genética. Para isso, o DNA das bactérias foi extraído segundo Fernandes *et al.* (2003) e submetido à amplificação pela técnica de PCR (polymerase chain reaction, reação da polimerase em cadeia). A amplificação foi realizada na presença do oligonucleotídeo (“primer”) específico BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA, em geral no espaço intergênico. Os produtos das reações 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. O polimorfismo dos produtos de PCR foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard. A aplicação dessa metodologia se deve a fato de que a amplificação de DNA de rizóbios com “primers” repetitivos tem-se mostrado como uma ferramenta útil no estudo de populações nativas ou introduzidas, bem como em análises de relações genéticas de isolados nativos, sendo capaz de diferenciar os isolados em nível de estirpes (Fernandes *et al.*, 2003; Grange & Hungria, 2004).

Resultados

Os isolados apresentaram uma correlação genética de 75% com a estirpe SEMIA 5079 (=CPAC 15) de *Bradyrhizobium japonicum*, utilizada em inoculante comerciais para a cultura da soja (*Glycine max*). Outros isolados foram agrupados com um nível de similaridade de 80% com *Bradyrhizobium*. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Zilli *et al.* (1998), em um estudo com 14 isolados microssimbiontes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), em que 11 dos isolados apresentam 85% de similaridade com *Bradyrhizobium*; esses autores sugeriram, ainda, a existência de novas espécies de *Bradyrhizobium*, além de *B. japonicum* e *B. elkanii*.

Kuykendall *et al.* (1992) também comentam sobre a possibilidade de novas espécies de *Bradyrhizobium*, o mesmo ocorrendo na análise genética de 58 isolados de rizóbios de regiões tropicais, em um estudo conduzido por Moreira *et al.* (1993).

Neste estudo, os isolados da Amazônia formaram diversos grupos e subgrupos e, em geral, foram agrupados com níveis de similaridade de 80 a 90%; o isolado INPA-RP6b foi o que apresentou menor correlação genética com os demais. Além disso, os isolados apresentaram baixo nível de similaridade (inferior a 20%) em relação à estirpe CIAT 899 de *Rhizobium tropici* e CFN 42 de *Rhizobium etli*. Moreira (2000) também relatou a predominância de estirpes apresentando características de *Bradyrhizobium* em solos ácidos da Amazônia.

O aumento do interesse na ecologia da comunidade microbiana tem conduzido à obtenção de diversos isolados de rizóbios. Com isso, observa-se um incremento no conhecimento sobre a evolução, a diversidade e ecologia de rizóbios (incluindo informações sobre a capacidade saprofítica e competitividade). Embora a engenharia genética seja uma ferramenta promissora para a produção de isolados de rizóbios eficientes quanto ao processo de fixação biológica do nitrogênio, o solo sempre continuará sendo o reservatório mais importante de isolados eficientes, competitivos e tolerantes a fatores de estresse abióticos e bióticos.

Conclusão

A maioria dos isolados provenientes de solos ácidos da Amazônia pertence ao gênero *Bradyrhizobium*. Houve indicações de uma nova espécie relacionada a este gênero.

Referências Bibliográficas

- BARBOSA, V.; FERREIRA, P. S.; MANO, D. M.; SCHLOTTER, M.; LANGENBACH, T. The impact of the herbicide atrazine on the diversity of rhizosphere microbial communities. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz de Iguaçu. **Resumos...** Microbiologia do solo, resumo M-44. p. 261. SBM: Foz do Iguaçu, 2001
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 911-920, 2003.
- FERREIRA, M. C.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; TAKEMURA, S. M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.627-637, 2000.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1389-1398, 2004
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 501-505, 1992.
- MOREIRA, F. M. S. Biodiversity of rhizobia from a wide range of forest leguminosae species in Brazil. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E., eds. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 181-182.
- MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total protein. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p.135-146, 1993.
- OLIVEIRA, L.A. de; MAGALHÃES, H.P. de Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.203-208, 1999.
- SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. Fixação biológica do nitrogênio por leguminosas forrageiras. In: Vargas, M. A. T. & Hungria, M. (eds). 1997. **Biologia do solos de Cerrados**. p. 127-152. 1997.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, 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.
- ZILLI, J. E.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. Diversidade genética em um sistema integrado de produção agroecológica In: FERTBIO 98, V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., 1998, Caxambu. **Resumos...** SBCS: Caxambu, 1998.