

Caracterização Fenotípica e Genética de Bactérias Fixadoras Simbióticas de Leguminosas Nativas e Exóticas do Sul do Brasil

Angélica Carla Onzi (PIBIC-CNPq); Jucimar Zacaria; Ana Paula Longaray Delamare; Sergio Echeverrigaray (Orientador) – aconzi@ucs.br

As bactérias fixadoras nodulíferas, associativas de plantas da família Leguminosae, são chamadas coletivamente de rizóbios. A fixação biológica de nitrogênio é um processo que converte nitrogênio atmosférico em nitrogênio utilizável pelas plantas (amônia). O presente trabalho visa avaliar a diversidade de rizóbios em leguminosas nativas e exóticas coletadas no Rio Grande do Sul e Uruguai e caracterizar os isolados fenotipicamente e geneticamente, através de PCR-RFLP do gene 16S rDNA.

Materiais e Métodos

Isolamento de colônias a partir de nódulos de plantas leguminosas

Os nódulos foram coletados no Rio Grande do Sul e Uruguai e as bactérias foram isoladas em meio YMA (Vincent, 1970) contendo vermelho congo e crescidas por até 10 dias à 37°C. A Embrapa Agrobiologia cedeu dezesseis estirpes de referência: *Bradyrhizobium japonicum* (BR114 = USDA06), *B. elkanii* (BR115 = USDA76), *Sinorhizobium fredii* (BR112 = USDA205 = ATCC35423), *S. saheli* (BR526 = USDA4893), *S. terengae* (BR527 = USDA4894), *Mesorhizobium ciceri* (BR521 = USDA3383), *M. mediterraneum* (BR522 = USDA3392), *M. tianshangense* (BR523 = USDA3592), *M. huakuii* (BR524 = USDA4779), *M. loti* (BR7801 = LMG6125), *Azorhizobium caulinodans* (BR5401 = LMG9993 e BR5410 = LMG6465), *Rhizobium galegae* (BR10055 = LMG6214), *R. leguminosarum* *bv.* *phaseoli* (BR10052 = LMG8819), *R. tropici* (BR322 = CIAT899) e *R. etli* (BR10026 = CFN42).

Caracterização Morfológica

Os isolados foram avaliados quanto a:

- Velocidade de crescimento (em dias), diâmetro das colônias, produção de polissacarídeos extracelulares (mucilagindade) e coloração;
- Alteração do pH do meio - através do crescimento em YMA com azul de bromo timol;
- Teste de Gram e análise de morfologia celular - através do método tradicional e observação microscópica;
- Utilização de fontes de carbono e nitrogênio - de acordo com o método proposto por Drouin *et al.* (1996). As fontes de carbono avaliadas foram: glicose, sacarose, arabinose, frutose, rafinose, lactose, ramnose, amido, inulina, sorbitol, trealose, maltose, inositol, ribose, acetato e citrato de sódio.

Caracterização molecular através de PCR-RFLP do gene 16S rDNA

Os isolados foram crescidos em meio YMA líquido, centrifugados, ressuspensos em água, diluídos 1/40 e utilizados diretamente nas reações de PCR. A amplificação das amostras foi realizada em reação de 25µl finais, contendo: 10mM Tris-HCl (pH 8,3); 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,25% Triton-X 100; 1,25mM dos desoxirribonucleotídeos; 0,120µl Taq DNA polimerase (5U/µl) e 2µl de suspensão de células. Os *primers* foram fD1d (5' – AGACTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e rP1a (5' – ACGGCTACCTTGTTACGACTT – 3') (Parker, 1999). As amplificações foram realizadas em Termociclador MJ Research, modelo PTC100, programado a 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 3 etapas, cada etapa de 1 min a 95°C, 1 min na temperatura específica dos *primers* e 2 min a 72°C, e uma extensão suplementar por 10 min a 72°C, seguidas de resfriamento a 4°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% diluído em TBE 1x (Trisma, EDTA e Ácido Bórico) e corados com Brometo de Etídeo (10mg/ml). Os *amplicons* foram visualizados sob luz ultravioleta de onda curta.

A digestão enzimática foi realizada incubando 12µl dos produtos de amplificação com 2,5U da enzima (*Hinf*I, *Hae*III e *Alu*I) (Gu *et al.*, 2007) e 2,5µl de tampão correspondente para cada enzima, num volume total de 25µl. As misturas de reação foram incubadas por 18 horas a 37°C. Os fragmentos oriundos da clivagem foram separados em géis de agarose 3%.

Resultados e Discussão

Isolamento das Colônias

Foram coletados nódulos de 83 plantas (fig. 1) em doze locais do Rio Grande do Sul e Uruguai. Entre as plantas coletadas encontram-se *Adesmia*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Glycine*, *Lotus*, *Lupinus*, *Mimosa*, *Phaseolus* e *Trifolium*. Foram isoladas (fig. 2) 133 bactérias.

Análise Fenotípica

Para a caracterização inicial dos isolados de rizóbio, foram utilizados parâmetros fenotípicos através de testes morfológicos como a produção de polissacarídeos extracelulares em meio de cultura com manitol, a velocidade de crescimento, o diâmetro, a coloração de colônias, a alteração do pH do meio (fig.3), o teste de Gram e a utilização de fontes de carbono.

Como todas as espécies de rizóbio são Gram-negativas e absorvem o reagente safranina (Hungria, 1994), a coloração de Gram permitiu a autenticação dos isolados (fig.4). A partir da coloração, foi possível verificar grande variação das bactérias isoladas, principalmente quanto ao tamanho das mesmas.

A análise de agrupamento baseada em características fenotípicas, permitiu a formação de dois grandes grupos (fig.5). Os isolados apresentaram diferenças fenotípicas especialmente quanto à cor e a produção de polissacarídeos.

Entre as 16 fontes de carbono testadas, sacarose e frutose foram as mais utilizadas pelos isolados. As fontes de carbono mais discriminantes foram o acetato, o citrato e a inulina.

Análise Molecular

A análise molecular realizada através de PCR-RFLP do gene 16S rDNA permitiu caracterizar diversos padrões. Entre os isolados testados até o momento, houve grande correlação entre estes e as estirpes de referência testadas.

Análise multivariada dos perfis permitiu separar os isolados em grupos de similaridade.

Considerações Finais

Apesar das características fenotípicas não permitirem a identificação dos isolados, as mesmas são de grande importância, uma vez que permitem o conhecimento das comunidades nativas e sua diversidade.

Os resultados obtidos a partir das análises fenotípica e molecular permitiram verificar uma grande diversidade de rizóbios para o Sul do Brasil.

Para a identificação das bactérias isoladas, serão realizados mais testes com PCR-RFLP do gene 16S rDNA e com os genes *nifH* e *nodC*.

Referências Bibliográficas

- Drouin, P.; Prévost, D.; Antoun, H. (1996) Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1016-1024.
- Hungria, M. (1994). Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: Hungria, M.; Araújo, R. S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa.
- Gu, J.; Wang, E.T.; Chen, W.X. (2007). Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 286-292.
- Parker, M. A. (1999). Relationships of Bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4914-4920.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for practical study of the root-nodule bacteria*. Oxford: Scientific Publications.



Lotus corniculatus



Desmodium sp.



Fig.2: Isolamento de Colônias

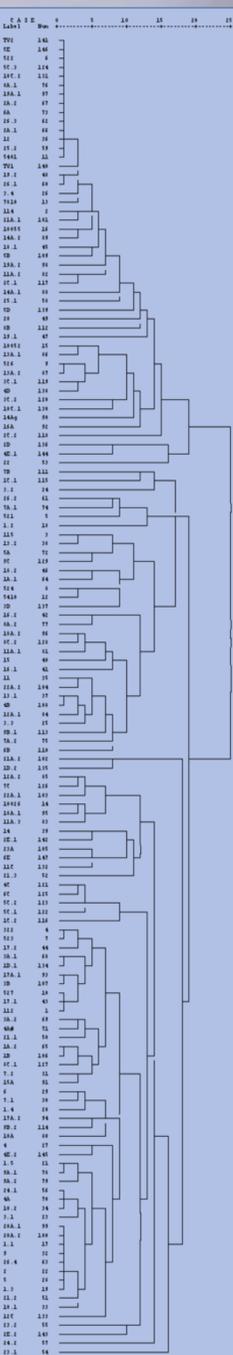
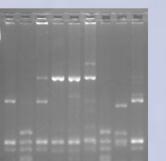


Fig.5: Dendrograma baseado nas características fenotípicas



Phaseolus vulgaris



Phaseolus vulgaris



Trifolium pratense



Lupinus sp.



Fig. 1: Destaque do nódulo coletado de pega-pega (Desmodium sp.)



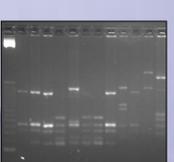
Fig.3: Alteração do pH do meio: reação ácida (amarelo) e alcalina (azul).



Fig.4: Coloração de Gram



Perfis de PCR do gene 16S rDNA



Perfis de RFLP do gene 16S rDNA



Mimosa sp.



Glycine max



Trifolium repens

APOIO:

