

Caracterização molecular de bactérias isoladas de nódulos de feijão-de-porco (*C. ensiformis*) cultivadas no Cerrado goiano

Lorena Cantuária de Oliveira¹ (IC)*, Enderson Petrônio de Brito Ferreira² (PG)(PQ), Karina Freire de Cã Nogueira Santos¹ (PG)(PQ), Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet¹ (PG)(PQ).

*Email autor: cantuarialorena@gmail.com

¹UEG – CCET. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Anápolis - Goiás - Brasil. Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903.

²EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Rodovia GO-462, Km 12, Fazenda Capivara, Zona Rural Caixa Postal: 179 CEP: 75375-000 - Santo Antônio de Goiás - GO

Resumo:

O feijão-de-porco é uma planta leguminosa utilizada como adubo verde, fornecendo tanto uma cobertura de solo como os nutrientes para uma cultura principal. O estudo da microbiota associada a esta planta pode auxiliar no entendimento do papel ecológico das interações entre planta/bactéria. Assim o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização bioquímica e molecular de bactérias isoladas de feijão-de-porco cultivadas no Cerrado. Para as caracterizações bioquímicas foram avaliados 18 isolados bacterianos a partir do perfil proteico total, obtido por eletroforese SDS-PAGE. Para a determinação molecular o DNA das amostras foi utilizado para PCR da região marcadora intergênica 16S-23S rDNA. Pela análise do perfil proteico foi elaborado um dendrograma com 56% de similaridade formação de sete grupos. Já na análise molecular a similaridade observada foi de 75% em cinco grupos. A partir destes resultados foi possível observar que as bactérias isoladas de feijão-de-porco possui uma variabilidade fenotípica das proteínas maior do que a genética e que já é possível supor uma diversidade nos endofíticos estudados. Estas bactérias podem ser utilizadas em testes in vivo e in vitro para avaliação da sua capacidade de promoção de crescimento para feijão-de-porco no Cerrado goiano, focando uma maior sustentabilidade para esta cultura.

Palavras chaves: Adubo verde. Bactérias endofíticas. Diversidade bacteriana.

Introdução

Os nitratos e nitritos são as formas utilizáveis do nitrogênio (N) pela planta, e podem ser produzidos naturalmente pela fixação biológica de nitrogênio, mediada por microrganismos (HUNGRIA & ARAUJO, 1994). Ainda aspectos fisiológicos e bioquímicos de bactérias associadas às plantas podem auxiliar na seleção como a avaliação da capacidade de produção de melanina, que está relacionada com a maior capacidade de nodulação (PIÑERO et al., 2007).

Nas leguminosas as bactérias do tipo rizóbios podem se associar com as raízes simbioticamente e produzir nódulos característicos onde ocorre a efetiva fixação biológica de nitrogênio, pela ação do complexo da enzima nitrogenase (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) é uma leguminosa da família Fabaceae, utilizada como adubo verde e capaz de realizar a FBN pela associação com os rizóbios. O feijão-de-porco é uma leguminosa conhecida como adubo verde, e é utilizada no sistema de plantio direto, sem aração do solo, que contribui melhorando a estrutura e fertilidade do solo diminuindo o aporte de insumos sintéticos (FERREIRA et al., 2016).

Pela caracterização bioquímica e genética é possível estabelecer a identificação correta das bactérias associadas ao feijão-de-porco para serem utilizadas em estudos ecológicos e autenticação das estirpes utilizadas na formulação de inoculantes comerciais (CHUEIRE, et al., 2003). A partir destas informações será possível delinear estratégias de seleção de estirpes eficientes no processo de fixação biológica do nitrogênio (COSTA, 2014). Assim o objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquímica e molecularmente bactérias isoladas de feijão-de-porco cultivadas no Cerrado goiano.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório Bioquímica de Microrganismos da CCET da Universidade Estadual de Goiás (UEG) localizado em Anápolis, Goiás.

Bactérias

Foram utilizadas as bactérias *Rhizobium etli* CFN42, *R. tropici* BR322, como referência para todos os testes. Foram utilizadas 18 bactérias isoladas dos nódulos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) obtidas em estudos posteriores, cultivado na região de Goiás Foi verificado a pureza dos isolados e estes foram mantidas em solução de glicerol 30% estéril a -20 °C.

Caracterização bioquímica

Para os ensaios as bactérias selecionadas foram crescidas em meio YM líquido a 30°C por 48h, e procedido às extrações das proteínas totais segundo (DUGHRI e BOTTOMLEY, 1983). Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) em gel descontínuo: 4,5% gel concentrador e 12,5% gel separador segundo (LAEMMLI, 1970). As condições de corrida e a coloração foram

realizadas segundo (SAMBROOK et al., 2000) e o gel foi fotografado em foto documentador com câmera digital.

Caracterização molecular

DNA das bactérias foi extraído segundo (CHUEIRE, 2003) e utilizado para a reação de amplificação pela técnica da PCR (polymerase chain reaction). A amplificação foi realizada utilizando o primer da região intergênica pHR (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3') e p23 (5'-GGTTCTTTTCACCTTTCCCTC 3') segundo Reis Júnior, Reis e Santos-Teixeira (2004). Os fragmentos obtidos foram analisados por gel de agarose (1%) segundo (SAMBROOK et al., 2000) e os géis foram observados em transluminador UV e fotografados com câmera digital.

Análise dos dados

Foi utilizado o software Vision Works para análise dos géis obtidos e assim foi possível o cálculo da média da massa molecular das proteínas dos isolados (kDa) utilizando um marcador de massa de referência. O perfil de bandas obtido nos géis de proteínas totais foi utilizado para elaboração de uma matriz binária e analisado no programa NTSYS pelo algoritmo UPGMA e Coeficiente de Jaccard (J) para geração de um dendrograma de similaridade (bioinformática).

Resultados e Discussão

Foram testados 18 isolados, obtidos de nódulos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Pela análise das proteínas totais dos isolados por SDS-PAGE foi possível identificar bandas que variam de tamanho 309 a 5 kDa (Figura 1 A e B). Um perfil padrão de bandas foi observado para certas bactérias (Figura 1 **A** linhas 1, 2, 3, 4 e 5; **B** linhas 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) que tem perfil de bandas muito semelhantes. Estas semelhanças se refletem no dendrograma onde os agrupamentos ocorreram no G1 e no G5 onde a similaridade estimada é de pelo menos 80% (Figura 2). Pelos dados é possível inferir que estes isolados pertençam a grupos taxonômicos próximos a família *Rhizobiaceae*. Não foi possível observar similaridade maior que 65% entre os isolados e os controles indicando que estes podem não pertencer a estas espécies *Rhizobium*.

Pelo dendrograma foi estimada uma similaridade média de 56% entre os isolados e as bactérias padrões com formação de sete grupos (Figura 2). Foi possível observar que em G1, 3 isolados (40.10, 40.22 e 40.30) apresentaram

similaridade de 100%. O mesmo foi obtido para os isolados 60.6, 60.7, 60.10 e 60.14 em G5 (Figura 2). Esta similaridade indica a semelhança fenotípica destes isolados indicando que estes podem pertencer ao mesmo gênero. Os demais isolados apresentaram menor similaridade revelando uma diversidade fenotípica do perfil proteico das bactérias estudadas (Figura 1 e 2).

A expressão fenotípica em proteína, revela as diferenças genéticas de isolados bacterianos, podendo ser utilizado para distinguir diferenças intra e inter específicas (DUGHRI E BOTTOMLEY 1983; MOREIRA et al., 2006).

A partir dos dados de PCR utilizando como marcador a região intergênica, 16S-23S rDNA foi realizada a análise de similaridade genética, sendo possível observar a formação de 5 grupos com similaridade de 75% (Figura 3). Nesta análise foram utilizados 12 isolados, pois para os demais não foi obtido amplificação. O grupo2 (G2) foi composto por 7 isolados com similaridade de 100% indicando baixa variabilidade para esta região e proximidade taxonômica destas bactérias.

Figura 1 - Análise eletroforética em SDS-PAGE das proteínas totais de 18 isolados bacterianos de nódulos de feijão-de-porco. **A:** Linhas 1) isolado 22-9; 2) isolado 40-10; 3) isolado 40-19; 4) isolado 40-22; 5) isolado 40-30; 6) isolado 60-23; 7) isolado 20-13; 8) Marcador; 9) isolado CFN 42; linha 10 isolado BR 322. **B:** Linhas: 1) isolado 60-15; 2) isolado SAF R3N3; 3) isolado 40-14; 4) isolado 44-4; 5) isolado 60-6; 6) isolado 60-7; 7) isolado 60-10; 8) isolado 60-14; 9) isolado 60-17; 10) isolado 60-22; 11) MARK; 12) isolado SAF R3N2.

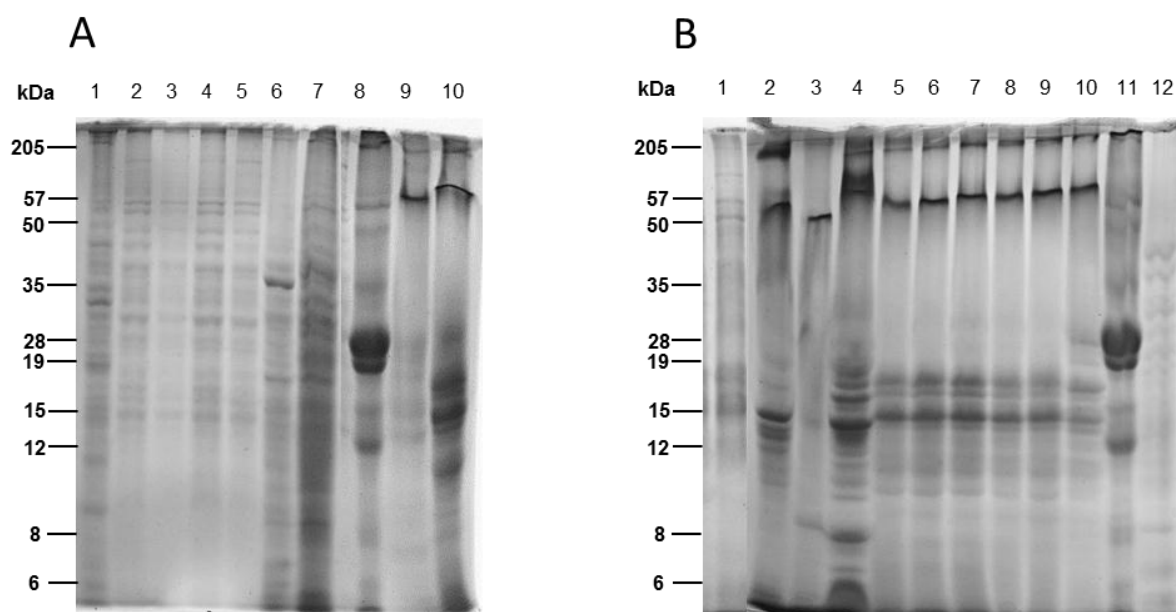
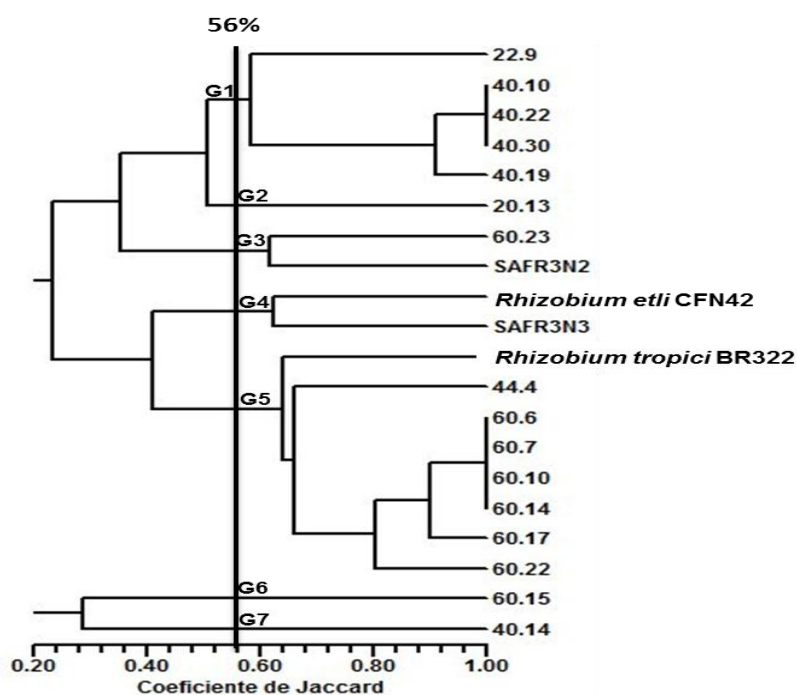


Figura 2: Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA com o coeficiente de similaridade Jaccard (software NTSYS-pc versão 2.10) dos dados de SDS-PAGE dos perfis das proteínas totais de 18 isolados de nódulos de feijão-deporco, bactérias padrão *Rhizobium tropici* (BR322) e *R. etli* (CFN 42).

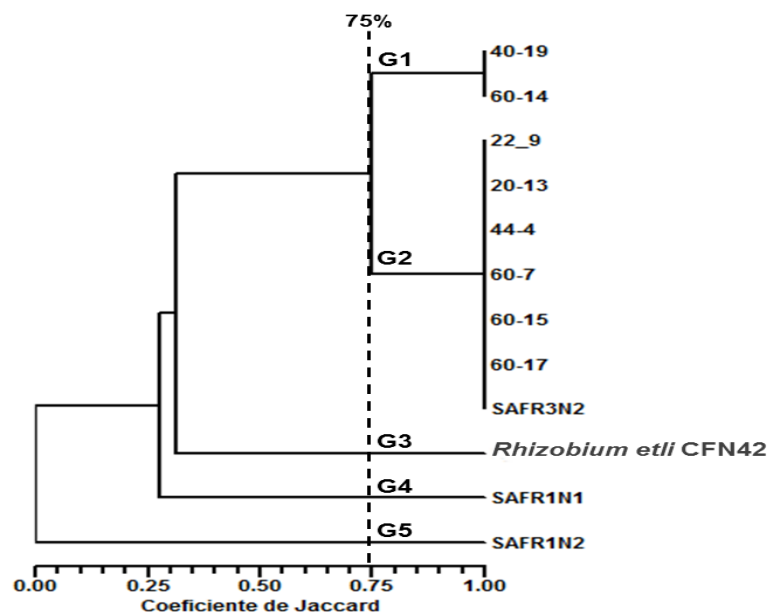


No G1 100% de similaridade também foi observada para os isolados 40-19 e 60-14, podendo ser estas do mesmo gênero. Já no G4 e G5, contendo os isolados SAF-R1N1 e SAF-R1R2 respectivamente, foram considerados menos similares em relação aos demais isolados. Também foi observada uma similaridade baixa com a bactéria de referência CFN42 (*R. etli*), indicando que os isolados não são relacionados filogeneticamente.

A região intergênica 16S-23S rDNA vem sendo utilizada como marcador para identificar heterogeneidade genética entre as amostras e permite a identificação de variação em grupos de microrganismos. Esta técnica simples com uma simples amplificação pode permitir a distinção de grupos genéticos e estimar a similaridade de grupos de bactérias endofíticas (BOAKYE et al., 2016).

Pela comparação dos dados genéticos e do perfil proteico houve baixa similaridade entre os agrupamentos indicando que estas devem ser consideradas em conjunto para uma análise mais robusta.

Figura 3: Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA com o coeficiente de similaridade Jaccard (software NTSYS-pc versão 2.10) do perfil de bandas da PCR da região intergênica (16S-23S rDNA) de 12 isolados de nódulos de feijão-de-porco, bactérias padrão *Rhizobium tropici* (BR322) e *R. etli* (CFN 42).



Pelos dados é possível afirmar que os isolados apresentam uma diversidade entre si e baixa similaridade com as bactérias de referência, sendo que novas estratégias de estudo devem ser realizadas para a determinação definitiva da taxonomia. Estes isolados de feijão de porco, deverão ter o sequenciamento da região gênica do 16S DNA ribossomal realizado para a colocação taxonômica definida.

Isolados de guandu do pantanal de Mato Grosso foi avaliado fenotipicamente e geneticamente, mas não foram utilizadas as mesmas metodologias que as utilizadas em nosso estudo (COSTA et al., 2014). Costa e colaboradores (2014) observaram uma grande diversidade, tanto fenotípica como genética, entre os 21 isolados avaliados indicando que as bactérias associadas a esta planta no ambiente com alta umidade é bem diverso.

Há poucos estudos com bactérias endofíticas de feijão-de-porco cultivadas no Cerrado sendo que os dados gerados neste trabalho são iniciais e poderão auxiliar no entendimento da microbiota associada a esta planta.

Pelos dados foi possível observar que os isolados avaliados no ambiente seco e de alta concentração de sais do solo do Cerrado apresentaram uma diversidade entre si, sendo que novas estratégias de estudo devem ser realizadas para a determinação definitiva da diversidade, baseada na determinação da taxonomia destas bactérias. Estes isolados de feijão-de-porco, deverão ter o sequenciamento da região gênica do 16S DNA ribossomal realizado para a colocação taxonômica definida, assim como testes de inoculação in vivo e in vitro deverão ser realizados para avaliar a possibilidade de utilização destes na formulação de inoculante para este adubo verde no Cerrado goiano.

Considerações Finais

- Pelas caracterizações do perfil proteico e análise genética da região intergênica 16S-23S rDNA de 18 isolados bacterianos de nódulos de feijão-de-porco foi possível observar uma diversidade fenotípica e genética entre as bactérias avaliadas.
- Os dados obtidos nesta caracterização serão utilizados em estudos posteriores para a seleção de bactérias para a formulação de inoculantes visando o cultivo sustentável de plantas de feijão-de-porco no Cerrado goiano.
- A caracterização desta população adiciona informações importantes ao conhecimento já existente sobre bactérias presentes em solos do Cerrado goiano colaborando para o entendimento da biodiversidade da microbiota neste Bioma.

Agradecimentos

A Prof.^a Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet por sua orientação. A Universidade Estadual de Goiás pela bolsa IC PIBIC/UEG. A todos os colaboradores do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, à Embrapa e ao INCT de Fixação Biológica de Nitrogênio.

Referências

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248-254, 1976.

BOAKYE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A.; OFFEI, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v. 69, pp 89–99, 2016.

CHUEIRE et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.

COSTA, F.M.; SHIAVO, J.A.; BRASIL, M.S.; LEITE, J.; XAVIER G.R.; FERANDES JR, P.I. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of th Brazilian Pantanal. **Genetics and Molecular Reserch**, v. 13, p. 469-482, 2014.

DUGHRI, M. H.; BOTTOMLEY P. J. Complementary methodologies to delineate the composition of *Rhizobium trifolii* populations in root nodules. **Soil Sci. Soc. Am.** v.47 p. 939-945, 1983.

FERREIRA L, et al. Microbial growth inhibition caused by Zn/Ag-Y zeolite materials with different amounts of silver. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v.142, p.141-147, 2016.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF, p.490, 1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

MOREIRA, F. M. M.; CRUZ, L.; de FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P. W.. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 197–206, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio. In: MOREIRA, F. M. S. ; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p.501-529, 2006.

PIÑERO, S. et al., Tyrosinase from *Rhizobium etli* Is Involved in Nodulation Efficiency and Symbiosis-Associated Stress Resistance. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v.13, p.35–44, 2007.

REIS-JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; SANTOS-TEIXEIRA, K. R. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.

SAMBROOK, J. et al. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual (Third Edition)**, p. 2100, 2000.

WEAVER, R.W., SEN D., COLI J.J., DIXON C.R. e SMITH G.R. Specificity of arrow leaf clover for rhizobia and its establishment on soil from crimson clover pastures. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v.53 p.731-734, 1989.