



## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS DE NÓDULOS DE SOJA CULTIVADA SOB DIFERENTES MANEJOS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIAL ISOLATES FROM NODULES OF SOYBEAN CULTIVATED UNDER DIFFERENT MANAGEMENT SYSTEMS

COSTA, M.R.<sup>1,2</sup>; MORAES, F.E.<sup>1</sup>; LEMOS, E.G.M.<sup>1</sup>; MERCANTE, F.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Campus de Jaboticabal, SP;

<sup>2</sup> Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS;

### Resumo

O estudo da diversidade genética de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, relacionada com diferentes sistemas de manejo da cultura da soja, é imprescindível para o entendimento das interações entre a população de rizóbios presentes no solo e as estirpes introduzidos pelos inoculantes microbianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de rizóbios provenientes de solos cultivados com soja sob diferentes sistemas de manejo, visando à maximização dos benefícios da fixação biológica de nitrogênio. Os isolados foram obtidos de nódulos de soja, em três safras agrícolas (2004/05, 2005/06 e 2006/07), sendo 39 do sistema convencional, 58 do sistema plantio direto e 22 do sistema integrado lavoura-pecuária. A partir de amostras de DNA extraídas das bactérias, foi estimada a diversidade genética destes 119 rizóbios isolados de nódulos de soja, além das estirpes, utilizando-se o marcador molecular fAFLP, sendo comparadas com as estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) recomendadas para a produção de inoculantes comerciais no País. Os resultados permitiram a divisão dos isolados em dois grupos. No primeiro grupo, posicionaram-se oito isolados oriundos do sistema plantio direto, obtidos na safra 2006-2007, além de dois representantes do sistema convencional desta mesma safra e das quatro estirpes de *B. elkanii* e *B. japonicum* avaliadas. No segundo grupo, foi observada uma heterogeneidade elevada entre os isolados provenientes dos diferentes sistemas de manejo (convencional, plantio direto e sistema integrado lavoura-pecuária), independentemente da safra agrícola de procedência. De modo geral, o marcador molecular fAFLP demonstrou ser uma técnica sensível para detectar polimorfismos em sequências de DNA de rizóbios obtidos de nódulos de soja. Além disso, verificou-se que o sistema de manejo de cultivo da soja influenciou a formação dos diferentes arranjos que compõem a árvore filogenética.

### Introdução

O aumento da produção e a elevação da capacidade competitiva da soja brasileira estão associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. Entre estas tecnologias, destaca-se o desenvolvimento de inoculantes com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (coletivamente chamados de rizóbios), selecionadas pela pesquisa e com elevada eficiência simbiótica, que resultou na independência da cultura em relação aos fertilizantes nitrogenados, sendo fundamental para viabilizar economicamente a cultura da soja no país (MERCANTE et al., 2011). Deve-se ressaltar que o sucesso da FBN, no Brasil, é resultado de pesquisas e de seleção de estirpes compatíveis com as cultivares brasileiras, com alta eficiência de FBN e adaptadas às diferentes condições ambientais em que a soja é cultivada no país (HUNGRIA et al., 2007).

Contudo, o estudo da diversidade genética de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, relacionada com diferentes sistemas de manejo na cultura da soja, torna-se de importância fundamental para o entendimento das interações entre a população de rizóbios presentes no solo e as estirpes introduzidos pelos inoculantes microbianos (GALLITERASAWA et al., 2003). Neste contexto, o uso do marcador molecular fAFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), que tem como base o uso da PCR, na sua forma fluorecente (fAFLP), é uma técnica utilizada para visualizar milhares de fragmentos de restrição de DNA amplificados, possibilitando o estudo de diversidade genética destes microorganismos (VOS et al., 1995).

Considerando o sistema dinâmico dos microrganismos do solo associado aos diferentes sistemas de produção agrícola empregados para o cultivo da soja, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de rizóbios isolados de nódulos de soja cultivada sob sistema convencional, plantio direto e integração lavoura-pecuária.

## **Material e Métodos**

### **Procedência dos isolados de bactérias**

As bactérias avaliadas pertencem à Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste e foram isoladas de nódulos de soja cultivada em sistema convencional (aração e gradagem), sistema plantio direto (PDA, PDB e PDC) e integração lavoura-pecuária (IA e IB), nas safras 2004-2005, 2005-2006 e 2006-2007.

Os sistemas de manejo foram implementados em 1995, com sistemas intensivos de produção, envolvendo: 1) sistema convencional (C), com cultivo de soja no verão e aveia no outono/inverno, sendo o solo preparado com grades de disco, numa área de 2,0 ha; 2) sistema plantio direto (PD), caracterizado pelo não revolvimento do solo e rotações de culturas, tendo o milho e a soja como culturas de verão, intercaladas com trigo, aveia e nabo forrageiro, em sistema subdividido em três faixas (A, B e C), ocupando 2,0 ha cada; e 3) sistema integrado lavoura-pecuária, subdividido em duas faixas (IA e IB), caracterizado pela alternância de lavoura (soja/aveia) com pastagem de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Syn. *Brachiaria decumbens* Stapf), conduzido no sistema PD, com ciclo de dois anos. Cada subparcela ocupa 4,0 ha, sendo que a gleba com pastagem tem sido submetida ao pastejo rotativo por bovinos. Ao longo dos anos de cultivo, a soja recebeu inoculação das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* e SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*.

### **Extração de DNA e uso do marcador molecular fAFLP**

A extração de DNA dos isolados de *Bradyrhizobium* spp foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas da UNESP- Jaboticabal, conforme o protocolo de MARMUR (1961). As amostras de DNA foram diluídas para 100 ng de DNA ml<sup>-1</sup> sendo então acondicionadas a -20 °C.

Para o uso do marcador molecular fAFLP foram testadas 6 possibilidades de combinações dos iniciadores: 1- EcoRI C-Ned/ MseI G/ 2- EcoRI G-Joe/ 3- MseI C; 3-EcoRI A-Fam/MseI G/ 4-EcoRI AG-Joe / MseI Ø/ 5-EcoRI T-Joe/ MseI CG e 6- EcoRI AT- Ned/ MseI C), utilizando as 115 amostras de DNA referentes aos isolados de rizóbios. Tal procedimento foi realizado conforme o AFLP (Microbial Mapping Protocol) da Applied Biosystem.

A análise dos dados foi conduzida através do software Genescan 3.1 (Perkin-Elmer), utilizado para determinar o comprimento dos fragmentos da amostra pela comparação com o tamanho do DNA padrão. Foram gerados eletroforegramas dos fragmentos com os tamanhos de 50-500 pares de base. Com os perfis de fAFLP obtidos de cada isolado, foi realizada uma matriz binária através do software Genotyper 2.5 (Perkin-Elmer). A matriz foi utilizada para a construção da árvore filogenética através do software Philip. O dendrograma foi gerado por UPGMA, através do software MEGA, ilustrando a distância genética entre os isolados.

## Resultados e Discussão

Os resultados permitiram a divisão dos isolados em dois grupos. No primeiro grupo, posicionaram-se oito isolados oriundos do sistema plantio direto, obtidos na safra 2006-2007, além de dois representantes do sistema convencional desta mesma safra e das quatro estirpes de *B. elkanii* e *B. japonicum* avaliadas. A estirpe SEMIA 5019 (*B. elkanii*) apresentou perfil idêntico ao isolado PDB 1.1 (safra 2006-07). O mesmo ocorreu com as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*B. japonicum*) em relação aos isolados PDC 3.5 e PDC 5.2, respectivamente.

No segundo grupo, foi observada uma heterogeneidade elevada entre os isolados provenientes dos diferentes sistemas de manejo (convencional, plantio direto e sistema integrado lavoura pecuária), independentemente da safra agrícola de procedência. Deve-se destacar que, nesse grupo, o isolado identificado como IA2.4 0405, obtido no sistema integrado lavoura-pecuária, formou um grupo independente dos demais pertencentes ao mesmo grupo monofilético. De modo geral, este grupo foi composto por mais de 90% dos isolados avaliados, verificando-se uma grande variabilidade entre estes; em todos os casos não foi observada distância genética nula (0,00) entre eles.

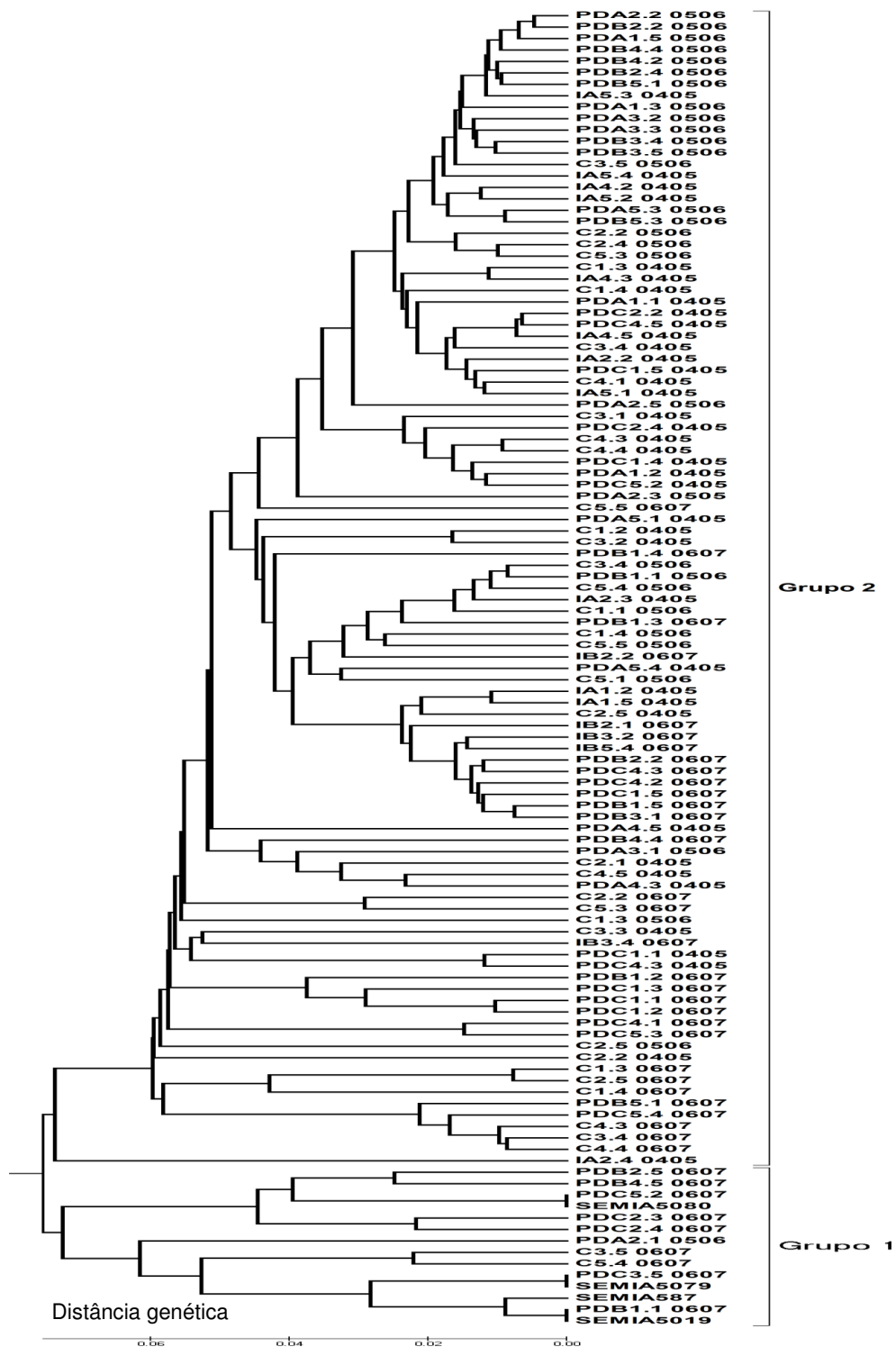
Deve-se salientar que a diversidade na população desses microrganismos tem sido atribuída a vários fatores que incluem aspectos bióticos, como mutação, transferência de genes entre estirpes e recombinação gênica, e fatores abióticos, como práticas de manejo do solo, alta temperatura e pH do solo. No entanto, um alto nível de diversidade genética pode também desempenhar uma função de tampão biológico em um ambiente, a fim de evitar o domínio de uma estirpe mais competitiva (GALLI e TERASAWA et al., 2003).

## Conclusões

O sistema de manejo de cultivo da soja influenciou a formação dos diferentes arranjos que compõem a árvore filogenética. De modo geral, a variabilidade entre os isolados de rizóbios avaliados foi evidenciada nos sistemas de manejo da soja, demonstrando uma distância genética nula (0,00) entre eles.

## Referências

- GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 19, n. 9, p 933-939, Sep. 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto. **brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. **Documentos**, 283).
- MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 3, n. 2, p. 208-218, Apr.1961.
- MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. **Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 4 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado Técnico, 169).
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Nov. 1995.



**Figura 1.** Árvore filogenética baseada na diversidade genética, através do uso do marcador fAFLP, de 119 isolados de soja e comparada com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019). Dendrograma gerado com o programa MEGA, versão 4.0, através do método de agrupamento UPGMA. PDA: plantio direto, faixa A; PDB: plantio direto, faixa B; PDC: plantio direto, faixa C; C: sistema convencional; IA: integração lavoura pecuária, faixa A; IB: integração lavoura pecuária, faixa B.