

Avaliação da eficiência na fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja e caracterização genotípica e da diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*

Fernando Gomes Barcellos¹; Pâmela Menna²; Jesiane Stefânia da Silva Batista³; Mariangela Hungria⁴. ¹Bolsista de pós-doutorado do CNPq; ²Bolsista de mestrado da CAPES; ³Bolsista de mestrado da Embrapa; ⁴Embrapa Soja.

Introdução

A fixação biológica do nitrogênio (FBN), através da inoculação da soja com estirpes selecionadas de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tem sido essencial na viabilidade econômica da cultura no Brasil, dispensando o uso de adubação nitrogenada (Hungria et al., 2005). O uso das estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019) resulta em uma economia estimada em mais de 3 bilhões de dólares por safra (Hungria et al., 2005). Entretanto, devido ao constante aprimoramento das práticas agrícolas, ao lançamento de cultivares mais produtivas e adaptadas às diferentes condições ambientais, bem como ao estabelecimento de populações de estirpes em solos previamente inoculados, faz-se necessário uma constante busca por genótipos de *Bradyrhizobium* mais competitivos e eficientes no processo de FBN. Para esta busca é necessário um prévio conhecimento da diversidade genotípica existente em relação às estirpes de *Bradyrhizobium* atualmente utilizadas nos inoculantes, assim como àquelas populações existentes nos solos das regiões cultivadas, as quais passaram por um processo de seleção natural e adaptação.

O estudo comparativo entre genomas que diferem quanto à eficiência e competitividade na FBN constitui-se em uma estratégia importante para a elucidação das bases genéticas relacionadas a essas diferenças possibilitando, assim, uma busca mais eficiente por genótipos de desempenho

produtivo superior. O uso dos marcadores moleculares e os resultados obtidos a partir do seqüenciamento de genomas têm representado ferramentas importantes utilizadas nos estudos de diversidade e caracterização genotípica de inúmeros organismos. No gênero *Bradyrhizobium* existem muitos estudos de diversidade e caracterização genotípica com o uso de marcadores moleculares, constatando-se, em geral, variabilidade genética elevada (Lilly et al., 2001). Isso também foi constatado com estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas no Brasil (Silva, 2003). A diversidade obtida através desses marcadores pode ser utilizada na busca de seqüências gênicas relacionadas às diferenças existentes quanto à competitividade e eficiência na FBN, sendo essas seqüências posteriormente caracterizadas. O Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja possui uma coleção com cerca de 1.500 isolados naturalizados, microssimbiontes de soja, bem como 150 estirpes de *Bradyrhizobium* provenientes de diversas leguminosas hospedeiras. Visto que poucos laboratórios no mundo estão estudando bactérias deste gênero, bem como pela importância das mesmas na FBN, tanto para a cultura da soja, como para diversas leguminosas nativas, torna-se estratégica a identificação de regiões gênicas relacionadas à FBN, visando a busca de genótipos superiores quanto à eficiência na FBN. Do mesmo modo, também é importante identificar regiões gênicas associadas à competitividade e capacidade saprofítica das estirpes.

Objetivos

Identificar e caracterizar genes relacionados à capacidade competitiva de estirpes e a eficiência na FBN com a cultura da soja, tomando como modelo estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*.

Material e Métodos

Foram utilizadas 17 estirpes de *B. japonicum* provenientes da coleção do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja. Duas dessas estirpes são consideradas parentais, SEMIA 586 e SEMIA 566 e as de-

mais são variantes naturais dessas estirpes, obtidas após adaptação ao solo, isto é, vários anos após a inoculação do solo e cultivo da soja.

Foram desenvolvidas as seguintes atividades: Análise da eficiência de FBN das estirpes de *B. japonicum* escolhidas e inoculadas na soja; Amplificação por rep-PCR ("repetitive regions - polymerase chain reaction", com os "primers" BOX-A1R e REP) dos DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum*; PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism", polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), dos genes ribossomais 16S das 17 estirpes de *B. japonicum*; Agrupamento das estirpes *B. japonicum* segundo níveis de similaridade obtidos com a aplicação das técnicas de rep-PCR e PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S.

Resultados

- Análise da eficiência da FBN das estirpes de *B. japonicum* escolhidas e inoculadas na soja

As plantas inoculadas com as 17 estirpes de *B. japonicum* foram avaliadas quanto à massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos formados na raiz (NN), massa dos nódulos secos (MNS), relação massa/número de nódulos (MSN/NN), nitrogênio total acumulado na parte aérea (NTPA) e eficiência dos nódulos (NTPA/MNS). Os experimentos foram realizados com três repetições e as médias agrupadas pelo teste de Tukey (SAS, 1989). As estirpes de *B. japonicum* pertencentes ao mesmo sorogrupo (sorogrupo SEMIA 566 ou sorogrupo SEMIA 586) não puderam ser agrupadas com relação aos parâmetros avaliados, pois dentro de cada sorogrupo foram encontradas estirpes mais e menos eficientes, com variações significativas em todos os parâmetros analisados (Tabela 1).

- Agrupamento das estirpes de *B. japonicum* segundo níveis de similaridade com base nos marcadores rep-PCR (com os "primers" BOX-A1R e REP) e PCR - RFLP dos genes ribossomais 16S:

Os DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum* foram amplificados por PCR ("polymerase chain reaction, reação em cadeia de polimerase") com o uso do "primer" BOX-A1R e REP. O gene ribossomal 16S foi amplificado

Tabela 1. Massa da parte aérea seca (MPAS, g/pl), número de nódulos (NN), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS, em mg/pl), relação massa/número de nódulos (MNS/NN), nitrogênio total acumulado na parte aérea (NTPA, mg N/pl) e eficiência dos nódulos (NTPA/MNS) das plantas de soja (cultivar BR 16) inoculadas com as 17 estirpes de *B. japonicum*.

Estirpe	MPAS	NN	MNS	MNS/NN	NTPA	NTPA/MNS
Sorogruppo SEMIA 566						
SEMIA 566	3,1600bcd [†]	133,33a	381,13de	3,0193b	95,71bcd	0,25367ab
CPAC 15 (SEMIA 5079)	2,2533cdef	111,67a	335,17f	3,2170b	51,13de	0,15227bc
S 127	3,2867bcd	113,00a	629,87a	5,6232a	112,07bc	0,17784abc
S 340	1,9533ef	101,33a	382,10def	3,6966b	75,10bcd	0,19686abc
S370	3,4867bc	114,67a	449,20cdef	4,0655ab	115,65bc	0,26584a
S372	3,1033bcde	138,33a	452,37cdef	3,3741b	89,59bcd	0,19145abc
S478	2,7933bcde	113,00a	454,70cdef	4,0517ab	77,35bcd	0,17141abc
S490	3,4233bc	124,33a	560,30abc	4,5016ab	102,32bcd	0,18665abc
S516	2,0633def	120,33a	409,70cdef	3,5303b	55,28de	0,13999c
Sorogruppo SEMIA 586						
SEMIA 586	3,3300bc	152,00a	487,50abcdef	3,2252b	99,88	0,20512abc
CPAC 7 (SEMIA 5080)	3,8600b	160,00a	538,97abcd	3,3686b	121,65b	0,22662abc
CPAC 390	2,4367cdef	101,33a	375,07ef	3,9515ab	66,65cd	0,18349abc
CPAC 392	3,5100bc	139,50a	527,35abcde	3,8423ab	86,97bcd	0,16393abc
CPAC 394	3,4900	115,00a	464,70bcdef	4,1120ab	86,55bcd	0,19090abc
CPAC 402	3,8700b	149,50a	580,25ab	3,8853ab	86,65bcd	0,14922bc
CPAC 403	3,2133bcd	141,00a	495,97abcde	3,5403b	75,32bcd	0,15408bc
CPAC 404	3,3950bc	144,50a	536,85abcd	4,5064ab	105,02bcd	0,19727abc

† Médias de três repetições e, quando seguidas da(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente pelo teste de Tukey P ? 0,05.

por PCR e o produto de amplificação submetido a clivagens com as enzimas de restrição *HhaI*, *HpaII* e *DdeI*. De acordo com os perfis de bandas apresentados, as estirpes foram agrupadas segundo níveis de similaridade. Com base nos índices de similaridade obtidos, com exceção das estirpes S 127 e CPAC 402, as estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo (sorogrupo SEMIA 566 ou sorogrupo SEMIA 586) foram semelhantes entre si, sendo possível distinguir os dois grupos. Já as estirpes S 127 e CPAC 402 apresentaram perfis de bandas distintos dos dois sorogrupos, apresentando índices de similaridade com as demais estirpes de 62,2% e 57,3%, respectivamente. Pelo seqüenciamento do gene 16S, constatou-se que a estirpe S 127 pertence, na verdade, à espécie *B. elkanii*, enquanto a CPAC 402 é uma estirpe de *Sinorhizobium sp.* Desse modo, o estudo sugere que ocorre transferência lateral de genes de FBN para rizóbios nativos do solo, o que está sendo confirmado pelo uso de outras técnicas moleculares.

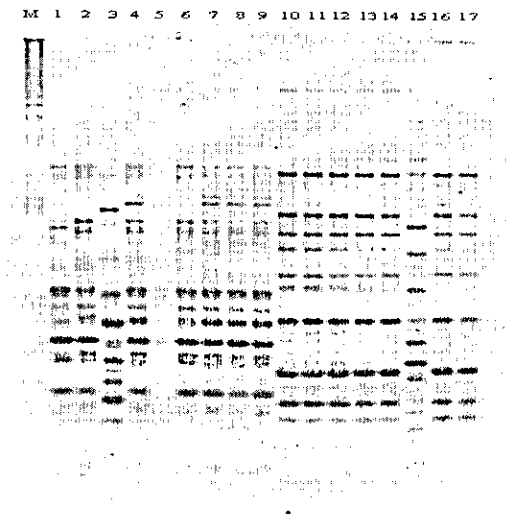


Figura 1. Amplificação por BOX-A1R PCR dos DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum*. M - marcador de peso molecular (Ladder 1Kb plus); - 1 a 9: estirpes do sorogrupo SEMIA 566: SEMIA 566 e suas variantes CPAC 15 e S 127, 340, 370, 372, 478, 490, 516 respectivamente; 10 a 17: estirpes do sorogrupo SEMIA 586: SEMIA 586 e suas variantes CPAC 7,390, 392, 394, 402, 403 e 404.

Considerações Finais

As metodologias de amplificação do DNA por rep-PCR , com os “primers” BOX-A1R e REP, bem como de PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S com três enzimas de restrição mostraram-se eficientes em estudos de diversidade genética, identificação de estirpes e monitoramento de estirpes de *Bradyrhizobium* no solo.

Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq 301241/2004-0, 400710/2004-8) e pelo PRONEX. Os autores agradecem a Ligia Maria O. Chueire pelo apoio na condução das análises.

Referências

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: GRAHAM, P. H. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).
- LILLY, M.S.; LOGANATHAN, P.; RANGARAJAN, S.; NAIR, S. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, p.276-281, 2001.
- SAS Institute. **SAS/STAT users guide**, Version 6, Vol. 2, 4th ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.
- SILVA, M.G.G. **Avaliação da diversidade genética de *Bradyrhizobium* pela análise de genes ribossomais**. 2003. 105 f. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.