

Diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* estabelecidas por inoculação em solos dos cerrados

Jesiane Stefânia da Silva Batista^{1,2}; Fernando Gomes Barcellos³; Pâmela Menna^{1,2}; Ieda Carvalho Mendes⁴; Mariangela Hungria¹. ¹Embrapa Soja; ²UEL; ³Bolsista CNPq; ⁴Embrapa Cerrados.

Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), considerada a principal via de incorporação do N₂ à biosfera, é um processo realizado por certos organismos procariontes, dentre os quais bactérias da ordem Rhizobiales, que estabelecem uma relação simbiótica através da formação de estruturas altamente especializadas, denominadas nódulos, nas raízes de algumas plantas, principalmente da família Leguminosae. Nos nódulos, ocorre a conversão do N₂ atmosférico à amônia, pelas bactérias, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pela planta hospedeira.

Bradyrhizobium japonicum e *B. elkanii* são bactérias do solo simbiontes de plantas leguminosas, dentre as quais a soja (*Glycine Max* (L.) Merr.), cultura de extrema importância para a balança comercial brasileira e, também, por desempenhar um papel relevante na nutrição da população.

Os solos brasileiros são, originalmente, livres de microssimbiontes da soja, tornando necessária a inoculação de sementes no estabelecimento dessa cultura no país, utilizando estirpes selecionadas. A independência de fertilizantes nitrogenados é uma das principais vantagens da cultura de soja no Brasil, pois, ao contrário do que freqüentemente ocorre em alguns outros países desenvolvidos, como nos E.U.A., as bactérias introduzidas via inoculação conseguem se estabelecer nos solos e suprir as necessidades de N da planta de modo mais barato, efetivo e ambientalmente seguro.

Quatro estirpes são recomendadas para utilização em inoculantes comerciais para a cultura da soja no Brasil: CPAC 15 (= SEMIA 5079, =566A) e CPAC 7 (=SEMIA 5080) da espécie *B. japonicum* e SEMIA 587 e SEMIA 5019 (=29W) da espécie *B. elkanii* (Chueire *et al.*, 2003). O Brasil possui legislação específica para o controle de qualidade de inoculantes, que devem apenas possuir estirpes recomendadas por um comitê de microbiologistas. Essa recomendação leva em consideração a efetividade no processo da FBN, bem como a habilidade competitiva e a persistência das estirpes no solo, que são fatores primordiais para o sucesso da inoculação.

Objetivos

Caracterizar a diversidade genética de estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* reisoladas da região dos Cerrados, após introdução em solo originalmente isento de bactérias capazes de estabelecer simbiose efetiva com a soja.

Material e Métodos

- Isolamento e crescimento das estirpes

Mendes *et al.* (2004) conduziram experimento de campo na Embrapa Cerrados, em Planaltina, D.F., com a finalidade de estudar a dinâmica de ocupação dos nódulos e a eficiência de FBN das estirpes recomendadas para a cultura da soja no Brasil. A Tabela 1 apresenta os tratamentos do ensaio, que foi conduzido com quatro repetições.

No sexto ano do experimento, foi realizado o reisolamento das estirpes a partir dos nódulos da soja (cultivar Doko) em meio de cultura sólido YM (manitol, 5,0g; K_2HPO_4 , 0,5g; NaCl, 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,2g; extrato de levedura, 1,0g; agar, 12g/L) acrescido de vermelho Congo 1% e azul de bromotimol 0,5% e caracterização sorológica das mesmas.

- Extração do DNA

Após o crescimento em meio líquido YM, as suspensões bacterianas foram centrifugadas, sendo o sobrenadante descartado e as células

Tabela 1. Tratamentos de inoculação conduzido em região isenta de estirpes capazes de estabelecer simbiose efetiva com a soja, em solos dos Cerrados.

| Tratamentos | | | | | |
|-------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| 1º Ano | 2º Ano | 3º Ano | 4º Ano | 5º Ano | 6º Ano |
| CPAC 7 | SI | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 7 | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 15 | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| CPAC 15 | SI | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 7 | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 15 | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| SI | SI | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 7 | CPAC 7 | SI | SC | SI |
| | CPAC 15 | CPAC 7 | SI | SC | SI |

SI: sem inoculação; SC: sem cultivo. No primeiro ano, as parcelas que não receberam inolante foram cultivadas com arroz, cultivar Rio Paranaíba.

bacterianas lavadas com solução salina (NaCl 0,85%), resuspensas em TE 50/20, tratadas com SDS 10%, proteinase K, lisozima e RNase e incubadas a 37°C por cerca de uma hora. Após a incubação, foram acrescentados NaCl 5M e AcONa 5M, seguido de um período de repouso a 4°C, antes da centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm; o sobrenadante foi recolhido e acrescido de etanol absoluto. Por fim, as amostras foram armazenadas por uma noite a -20°C, sendo o etanol posteriormente descartado e o precipitado resuspenso em TE 10/1. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, para a determinação da concentração e da pureza do DNA.

- Perfil de PCR-RFLP do gene 16S rRNA

O DNA de cada amostra foi submetido à reação de PCR (“polimerase chain reaction”) com a finalidade de amplificar a região específica do gene 16S rRNA que possui, aproximadamente, 1.500 pares de bases. Uma solução ‘mix” foi preparada para a reação de amplificação, consistindo de dNTPs (0,3mM de cada base), tampão 10X, MgCl₂, Taq DNA polimerase e os “primers” fD1 (5’ – cgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

– 3') e rD1 (3'– cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC – 5'). O resultado da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a verificação de polimorfismo do gene 16S rRNA, os produtos de PCR foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *HhaI* (5' – GCG/C – 3'; 3' – C/GCG – 5'), *HpaII* (5' – C/CGG – 3'; 3' – GGC/C – 5') e *DdeI* (5' – C/TNAG – 3'; 3' – C/GCG – 5'). Para cada reação, o volume de reagentes utilizado foi de 0,5mL de enzima (10U/mL), 1mL de tampão específico, 6mL do produto de PCR e 2,5mL de água mili-Q estéril, seguido de incubação a 37°C em termociclador pelo tempo recomendado pelo fabricante. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3%; os géis foram fotografados após a coloração com brometo de etídio, para análise dos perfis obtidos utilizando o programa BioNumerics, (Applied Mathematics, Bélgica), juntamente com os padrões de outras estirpes significativas.

Resultados e Discussão

Foram reisoladas, no sexto ano do experimento, 263 estirpes, a partir dos nódulos da soja das parcelas que receberam inoculantes com estirpes de *B. japonicum*. Através de comparação dos padrões de restrição do gene 16S rRNA das estirpes reisoladas com as estirpes padrões, foi possível constatar que 62,73% das estirpes eram pertencentes ao sorogrupo da CPAC 15, confirmando a elevada habilidade competitiva e saprofítica dessa estirpe, que também é caracterizada por seus elevados índices de N₂ fixado, enquanto 11,02% das estirpes foram classificadas como pertencentes ao sorogrupo da CPAC 7. Além disso, 23,19% das bactérias isoladas foram classificadas como *B. elkanii*. Tal ocorrência pode ser atribuída a prováveis contaminações durante o experimento.

Os padrões de restrição obtidos pela digestão com as três enzimas utilizadas foram suficientes para permitir a identificação das espécies das estirpes reisoladas, bem como a distinção entre estirpes pertencentes a diferentes sorogrupos de *B. japonicum*. O mesmo não foi possível para distinguir sorogrupos de *B. elkanii*, pois, devido à conservação das seqüên-

cias de 16S rRNA, esse método pode ter limitações na identificação intraespecífica.

Notavelmente, sete das estirpes reisoladas (o que corresponde a 2,66% do total) apresentaram padrões de restrição discrepantes em relação aos padrões de *B. japonicum* e *B. elkanii*; visto que o solo era isento de bactérias capazes de estabelecer simbiose com a soja, análises mais refinadas dessas estirpes devem ser conduzidas para sua caracterização.

Algumas bactérias apresentaram padrão de PCR-RFLP do gene 16S rRNA não condizente com a caracterização sorológica, que é uma metodologia rotineira de identificação, em muitos casos indicando diferentes espécies nas análises realizadas. Perfis genotípicos contrastantes com os perfis sorológicos de rizóbios já haviam sido relatados por Santos et al. (1999). Hipóteses como a ocorrência de rearranjos genômicos e a transferência lateral de genes simbióticos e de fixação de estirpes inoculadas para bactérias nativas podem explicar a diversidade desse organismos.

Considerações Finais

Uma porcentagem significativa das estirpes de *Bradyrhizobium* simbiotes da cultura da soja sofre alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas poucos anos após a introdução, via inoculação, nos solos. Essas alterações devem ser monitoradas e compreendidas, para verificar os efeitos dessa nova população na contribuição da fixação biológica do nitrogênio.

Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq (301241/2004-0 e 400710/2004-8).

Referências

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes

de rizóbios recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, Brasil, v.27, p.833-840, 2003.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Cerrado oxidol. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.40, p.28-35, 2004.

SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.30, p.261-272, 1999.