

## **Efeito de diferentes manejos de solo e de culturas na diversidade genética de rizóbios microssimbiontes da soja**

---

Alan Alves Pereira<sup>1</sup>; Rubens J. Campo<sup>2</sup>; Julio Cezar Franchini<sup>2</sup>; Eleno Torres<sup>2</sup>; Mariangela Hungria<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de especialização da Embrapa; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

O Paraná sempre ocupou posição de liderança na adoção de práticas conservacionistas do solo, contudo, o efeito dos diferentes manejos na biodiversidade microbiana do solo ainda é pouco conhecido. A soja ocupa posição de destaque no Brasil e no Paraná e a viabilidade econômica da cultura está diretamente relacionada ao processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN), em que a simbiose com bactérias conhecidas coletivamente como rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*) consegue suprir as necessidades da planta em nitrogênio (N). Estima-se que a economia resultante do processo de FBN com a soja seja da ordem de 3 bilhões de dólares por safra, que deixam de ser gastos com fertilizantes nitrogenados. Além disso, a FBN contribui para diminuir o uso de fontes energéticas não-renováveis, necessárias para a síntese de fertilizantes nitrogenados, bem como para a menor poluição de lagos, rios e lençóis freáticos com nitrato e a menor emissão de gases com efeito estufa.

O objetivo desse estudo foi verificar o efeito do manejo do solo e das culturas na diversidade de rizóbios microssimbiontes da cultura da soja.

O ensaio utilizado para este estudo vem sendo conduzido há dez anos na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, em Londrina, em delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, incluindo os tratamentos de plantio direto (PD) ou plantio convencional (PC), com sucessão das culturas soja e trigo (*Triticum aestivum*), ou rotação com diversas espécies: nabo forrageiro (*Raphanus sativus*)/milho (*Zea mays*)/aveia

preta (*Avena strigosa*)/soja/trigo/soja/trigo/soja. Nesse ensaio, foram realizadas várias avaliações das propriedades químicas e físicas do solo, contudo, pouco se sabe sobre o efeito do manejo do solo e das culturas na diversidade microbiana do solo.

## Material e Métodos

Foram coletados nódulos das raízes de dez plantas de soja por parcela, procedendo-se ao isolamento de rizóbios de 30 nódulos por parcela, escolhidos ao acaso. Usando técnicas microbiológicas básicas, procedeu-se ao isolamento, à purificação, à caracterização morfológica e à estocagem dos rizóbios. A seguir, foi efetuada a extração de DNA, segundo Fernandes et al. (2003). O DNA foi amplificado pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction", reação em cadeia de polimerase) com o "primer" BOX-A1R, que amplifica regiões repetitivas e conservadas do DNA, normalmente no espaço intergênico, segundo protocolo de Fernandes et al. (2003). O DNA também foi amplificado com o "primers" para a região do 16S rRNA, seguido pelo corte com três enzimas de restrição, utilizadas individualmente, *Hpa*II, *Hha*I e *Dde*I. Essa técnica é denominada de RFLP ("restriction fragment length polymorphism", polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)-PCR e as análises foram conduzidas segundo Fernandes et al. (2003).

Os perfis de DNA amplificados foram submetidos à análise de agrupamento, usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica), com o algoritmo UPGMA ("unweighted pair-group method with arithmetic mean") e o coeficiente de Jaccard, que considera a presença de bandas.

## Resultados

A soja é uma planta exótica, originada da China, que foi introduzida no Brasil provavelmente em 1882, na Bahia, mas o cultivo em larga escala no Paraná iniciou-se apenas na década de 1960. Os solos brasileiros não possuem, originalmente, rizóbios capazes de nodular a soja de modo eficaz, de modo que algumas poucas estirpes foram introduzidas via

inoculantes. Os inoculantes utilizados em Londrina desde a expansão da cultura introduziram um máximo de dez estirpes, contudo, a diversidade genética observada nos isolados de rizóbio deste ensaio foi bastante elevada. Considerando-se a análise por BOX-PCR, em que seria possível verificar a variabilidade entre estirpes, no tratamento PC com sucessão soja/trigo, os perfis de DNA obtidos resultaram em um agrupamento final com uma similaridade genética de 12%. No caso do PC com rotação de culturas, o nível de similaridade foi de 25%. No PD com sucessão, as estirpes foram agrupadas em um nível final de similaridade de 46%, enquanto no PC com rotação de culturas foi de 25%. Considerando-se o nível de similaridade de 70%, no qual pode-se definir que as estirpes são bastante distintas, as relações de perfis de DNA distintos/perfis de DNA obtidos foram de: 9/32 (PC-R), 12/43 (PC-S), 11/37 (PD-R) e 8/53 (PD-S). Além disso, os perfis obtidos em cada tratamento foram distintos dos demais tratamentos e, quando todas as estirpes foram analisadas em conjunto, constatou-se diversidade genética elevada (Fig. 1). Considerando a análise por RFLP-PCR da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, também se constatou grande variabilidade genética. Essa análise permite a definição de espécies. As duas únicas espécies de microssimbiontes da soja que foram introduzidas no solo foram *B. japonicum* e *B. elkanii*. Contudo, considerando o nível de similaridade de 70% na análise de agrupamento, constatou-se que 19 espécies prováveis foram isoladas (Fig. 2). A variabilidade genética entre rizóbios adaptados pode resultar da transferência lateral de genes, bem como da recombinação gênica, perda e ganho de genes, que estão ocorrendo em uma taxa bastante elevada nas condições tropicais.

## Considerações Finais

A diversidade genética dos rizóbios microssimbiontes da soja foi consideravelmente incrementada pelo tempo de cultivo da soja, em todos os sistemas de manejo de solo e de culturas estudados. Essa variabilidade pode representar um "efeito tampão", permitindo a sobrevivência dos rizóbios e FBN em diversas condições ambientais, mas também pode dificultar a introdução de novas estirpes mais eficientes no solo.

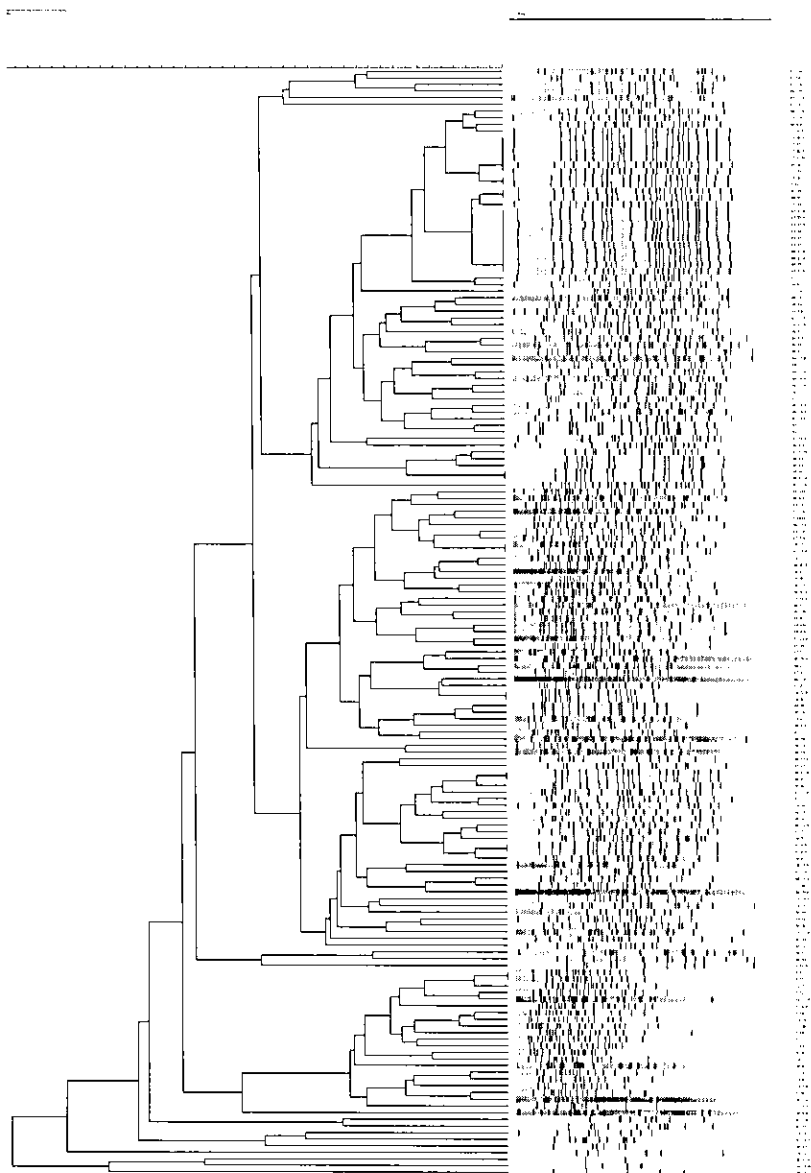


Figura 1. Análise de agrupamento (UPGMA e coeficiente de Jaccard) dos produtos obtidos pela análise de BOX-PCR, de rizóbios isolados de nódulos de soja sob diferentes sistemas de manejo de solo e de culturas.

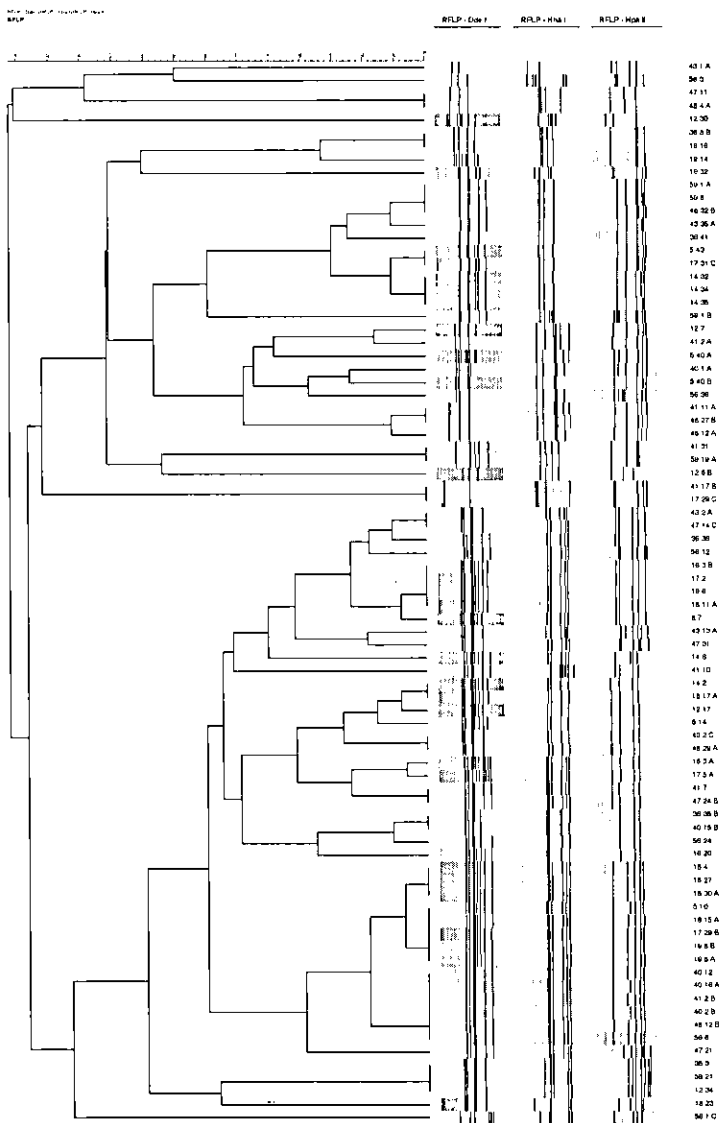


Figura 2. Análise de agrupamento (UPGMA e coeficiente de Jaccard) dos produtos obtidos pela análise de RFLP-PCR da região gênica do 16S rRNA, seguida pelo corte com três enzimas de restrição, de rizóbios isolados de nódulos de soja sob diferentes sistemas de manejo de solo e de culturas.

## Agradecimentos

Projeto parcialmente financiado pela Fundação Araucária (convênio 046/2003) e pelo CNPq (301241/2004-0).

## Referências

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 2003. v.38, p.911-920.