

## Diversidade Genética de Rizobactérias obtidas de Distintos Manejos Agrícolas da Região Oeste do Paraná via PCR-RFLP

Everton Geraldo Capote Ferreira<sup>1</sup>, Lucas Eduardo Schuster<sup>1</sup>, Walkyria Neiverth<sup>2</sup>, André Riedi Barazetti<sup>1</sup>, Andressa Caroline Patera<sup>1</sup>, Silvia Lara Loch Leduc<sup>1</sup>, Angelica Luana Kehl da Silva<sup>1</sup>, Marco Antônio Barcelar Barreiros<sup>1</sup>, Luciana Grange<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná – UFPR Setor Palotina  
CEP 85950-000, Palotina – Pr - E-mail: lucas.e.schuster@gmail.com

<sup>2</sup>Embrapa - soja – Departamento de Agrometeorologia  
Caixa Postal 231 – 86001-970 Londrina – Pr

### RESUMO

*Visando reduzir custos com adubação nitrogenada e considerando o grande potencial biotecnológico dos microrganismos de solo, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de rizobactérias obtidas de distintas classes de solos da região oeste do Paraná cultivados sob diferentes manejos. Foram isoladas 400 estirpes, destas 269 foram submetidas à reação de Rep-PCR e destas, selecionou-se 103 estirpes para análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene 16S rRNA. A biodiversidade encontrada pela análise estabeleceu um total de 10 agrupamentos genéticos, dos quais determinados manejos agrícolas, como o cultivo de crotalária, contribuíram com uma maior abundância de isolados. Os resultados demonstraram uma alta diversidade em todas as regiões avaliadas, apontando a influência concomitante dos diferentes manejos de cultivo e tipo de vegetação sobre a dominância de determinados grupos genéticos dentro das comunidades.*

**Palavras-chave:** diversidade, rizobactérias, manejos agrícolas, PCR-RFLP, solos, FBN.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, o aperfeiçoamento dos manejos sustentáveis e a exploração da biodiversidade microbiana dos solos têm sido utilizados como importantes ferramentas para o incremento tanto da produção agrícola quanto da sustentabilidade dos diferentes ecossistemas<sup>1</sup>. Dentre as necessidades básicas dos sistemas vegetais está o fornecimento adequado de nitrogênio (N<sub>2</sub>), principal molécula responsável pelo desenvolvimento das plantas. Uma alternativa para minimizar essa problemática e melhorar a obtenção de N<sub>2</sub> por parte das plantas cultivadas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esta tecnologia pode promover a diminuição da adubação mineral, melhorar a qualidade ambiental dos sistemas agrícola e ainda diminuir consideravelmente os custos de produção.

As plantas são consideradas um complexo microecossistema composto por diferentes *habitats*, sendo colonizadas simultaneamente por grande diversidade de bactérias endofíticas<sup>3</sup>. Neste contexto, uma melhor compreensão da diversidade genética das populações presentes na rizosfera pode auxiliar no conhecimento de como as variações no ambiente podem influenciar na funcionalidade destes micro-organismos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo

geral estudar a diversidade genética de rizobactérias obtidas de distintas classes de solos da região oeste do Paraná cultivados sob diferentes manejos, e com isto, identificar indivíduos com potenciais biotecnológicos para a FBN e para a promoção de crescimento vegetal (PCV).

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de solo nas regiões extremo Oeste, Centro Oeste e Noroeste do estado do Paraná. As áreas de coleta foram classificadas quanto ao manejo de cultivo e classe de solo, identificados como: monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P e aplicação de vinhaça) (M1); monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P e aplicação de P mineral) (M2); plantio de crotalária (M3); mata ciliar (M4); pousio antecedido de cana, milho e soja (M5); rotação de cultura com cana, soja, milho e cana (M6); sucessão milho, trigo (M7); sucessão milho, soja RR (M8); sucessão milho, soja (M9) e sucessão milho, soja orgânico (M10). As áreas M1, M2, M3, e M6 foram classificadas como ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico abruptico (S1); M4 como ARGILOSO VERMELHO eutrófico típico (S2); M5 como LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (S3); M7, M8 e M10 como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico (S4) e M9 como NITOSSOLO VERMELHO eutrófico latossólico<sup>4</sup>.

#### Obtenção dos isolados

Para a obtenção dos isolados, 10 gramas de cada solo foram diluídas em 90 mL de solução salina a 0,85% e destas, 1 mL foi transferido para um novo frasco proporcionando uma diluição de  $10^{-2}$ . Cada amostra de solo foi inoculada em planta-isca de trigo (variedade BRS Pardela) e cultivada em sacos plásticos<sup>5</sup> com solução nutritiva para serem mantidas em casa de vegetação durante 30 dias. Posteriormente estas plantas foram superficialmente esterilizadas<sup>6</sup>, maceradas em solução salina e diluídas a  $10^{-3}$ . Para obtenção dos isolados, placas contendo meio Dygs<sup>7</sup> foram inoculadas e mantidas a 27°C por aproximadamente 60 horas para repicagem até obtenção de colônias puras.

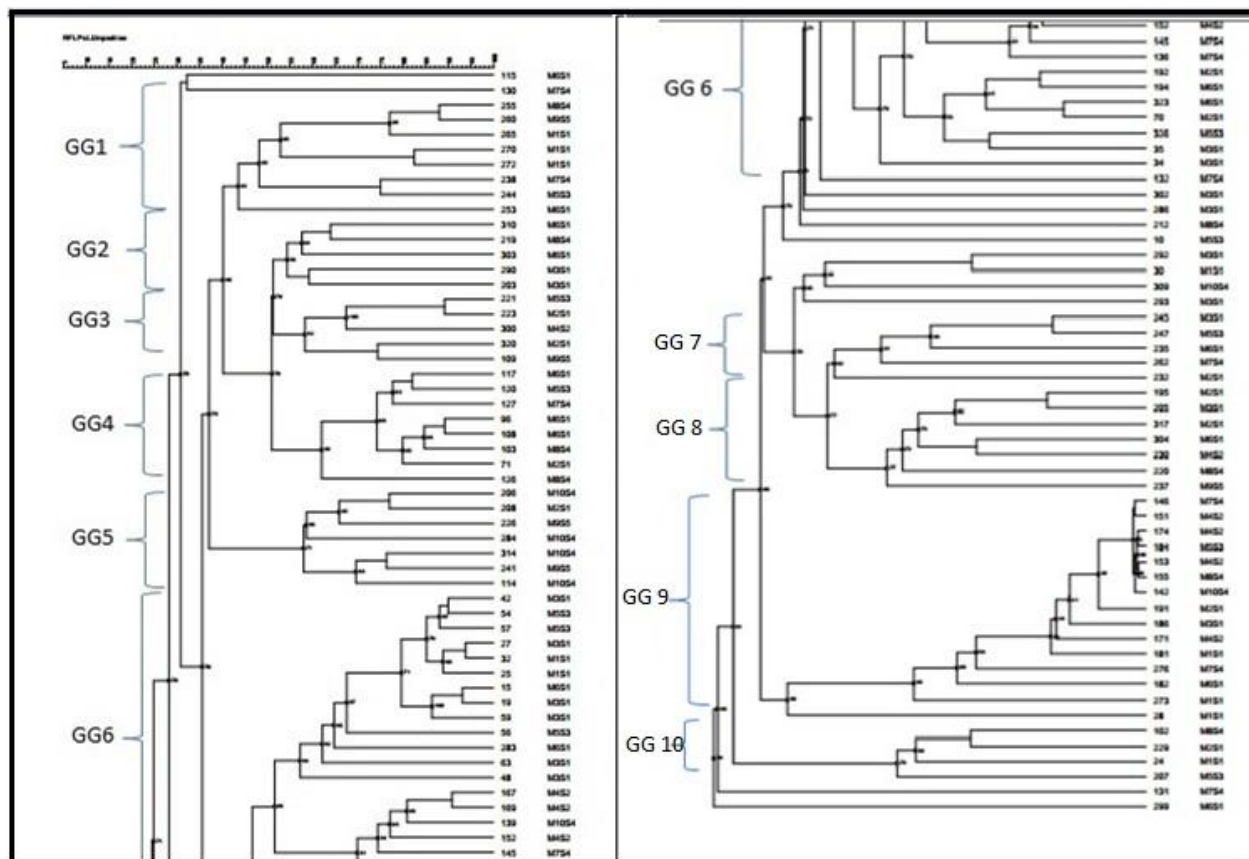
#### Análise do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene 16S rRNA

A extração de DNA genômico foi realizada a partir das colônias puras<sup>8</sup>, a quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro e a pureza e integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Foram selecionados previamente por *Rep*-PCR (repetitive extragenic palindromic sequence), os isolados mais polifórmicos com base nos agrupamentos obtidos (103 isolados). Procedeu-se a amplificação do gene ribossomal 16S dos isolados com os "primers" fD1(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')-rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3')<sup>9</sup> e os produtos obtidos foram digeridos com as seguintes enzimas: *Hha* I, *Hae* III, *Mbo* II, *Hap* II, *Hinf* I, *Afa* I conforme instruções do fabricante (Gibco – Life technologies). A análise dos produtos obtidos pelas digestões foi realizada pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01) utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Jaccard.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O dendrograma com as seis enzimas utilizadas (Figura 1) mostrou que as estirpes agruparam em um nível final de similaridade de 35%. Os perfis apresentaram-se distribuídos entre dez grandes grupos (GGs) formados, além de 13 perfis considerados isolados. O GG6 foi o que apresentou o maior número de perfis (26) com destaque para o manejo com cultivo de crotalária (M3S1), pois este contribuiu com o maior número de perfis (8). Com 15 perfis, o segundo maior GG foi o GG9 e o maior número de perfis deste agrupamento referiu-se a

isolados obtidos a partir de mata ciliar (M4S2), com um total de 4 perfis. O GG10 apresentou o menor número de perfis (4). Dentre os perfis ditos isolados, o manejo M3S1 contribuiu com o maior número de estirpes (4), seguidos do M7S1 (3). Não há nenhum GG apresentando todos os manejos de solo, também não há GG apresentando todos os perfis a partir de um único solo.



**Figura 1.** Dendrograma obtido pelo RFLP-PCR.

O uso de leguminosas forrageiras como, por exemplo, a crotalária, em consórcio com culturas de Poaceas, vem sendo bastante estudado por conta do seu potencial para suprir o N em pastagens devido a sua alta capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas<sup>10</sup>. Esta característica simbiótica do manejo em questão pode ter sido o fator determinante para o maior número de isolados dentro do GG4. Já em relação ao GG9, onde o manejo referente à mata ciliar foi o maior contribuinte e dentre os fatores responsáveis por condições mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano, merecem destaque a ausência de preparo do solo e a maior diversidade florística dessas áreas. O não revolvimento do solo também favorece o acúmulo da serrapilheira na sua superfície, o que propicia a ocorrência de menor variação e de níveis mais adequados de temperatura e umidade<sup>11</sup>.

### CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram a ocorrência de uma alta diversidade nas áreas de coleta, considerando-se as diferentes práticas de manejo. Os agrupamentos genéticos deste trabalho

apontaram que o manejo de cultivo e a vegetação característica das diferentes áreas de coleta influenciaram concomitantemente na dominância de determinados grupos genéticos dentro das comunidades.

### REFERÊNCIAS

- (1) ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P., BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; & CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1367-1380, 2007.
- (2) BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 80, p. 199-209, 2008.
- (3) LODIEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M. & van der LEITE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews* in **Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.
- (4) BHERING, S. B.; SANTOS, H. G. **Mapa de solos do Estado do Paraná, Legenda Atualizada**. Rio de Janeiro: Embrapa Florestas: Embrapa Solos: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 74, 2008.
- (5) CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. In. XIII RELARE. **Anais**. Documentos 290. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja. Londrina, Paraná: p 89-123, 2007.
- (6) ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (eds). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA- SPI, p.63-94, 1994.
- (7) BALDANI, V. Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In. XIII RELARE. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 290, p. 124-142, 2007.
- (8) HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P. et al. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR, Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico 79).
- (9) MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-32, 2006.
- (10) REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Fixação Biológica do Nitrogênio associada a pastagem de braquiária e outras gramíneas forrageiras. **Documentos 52**. ISSN 1517-5111, dezembro de 2002.
- (11) MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. d. Uso de parâmetros microbiológicos como indicadores para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas. **Documento 112**, Embrapa-cerrado, Planaltina, DF., p.1517-5111, 2004.