

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



USO DA TÉCNICA ANDRA PARA AVALIAR A VARIABILIDADE DE ESTIRPES DE RIZÓBIO QUE NODULAM A SOJA CULTIVADA COM HERBICIDA

SCHNEIDER, Léa¹; BOHM, Giani Mariza Barwald¹; ROMBALDI, César Valmor²

¹ Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas, praça 20 de setembro, 455 – Centro – Pelotas/RS, E-mail: gbbohm@terra.com.br; ² Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

Entre os principais fatores bióticos que contribuem para a elevada produção de soja destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), uma vez que a demanda de nitrogênio das cultivares brasileiras pode ser suprida totalmente pelo processo biológico, por meio da inoculação com estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (HUNGRIA & CAMPO, 2005). A manutenção da relação simbiótica da planta com as bactérias fixadoras de nitrogênio é importante para se obter uma boa produtividade sem necessidade de incrementar esse nutriente do solo por fonte externa.

O efeito do glifosato sobre as bactérias simbiontes (*B. japonicum*) e sobre a redução de acetileno em condições de ensaio em meio de cultura e em casa de vegetação foi citado por ZABLOTOWICZ & REDDY (2004). Concentrações de glifosato de 0,5 e 1,0 mM inibiram a redução de acetileno a partir de 20% a 28% nas cepas mais sensíveis e, nas cepas mais tolerantes, de 8% a 20%, respectivamente. MALTY et al. (2006) avaliaram o efeito do glifosato sobre três estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29, INPA 80A e INPA 553A) e uma de *Bradyrhizobium japonicum* (BR 86), em meio de cultivo com concentrações crescentes do herbicida (0 a 454 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Nesse experimento, foi verificado que o glifosato apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Bradyrhizobium* em meio de cultura. Complementarmente, estudaram os efeitos sobre a nodulação da soja, em casa de vegetação, em solo que recebeu, antes do plantio, dosagens crescentes do herbicida de 600 até 4800 g ia ha⁻¹. Nesse caso, não houve efeito sobre a nodulação, evidenciando que as respostas são distintas dependendo do modelo de estudo (*in vitro* ou em casa de vegetação).

Nesse estudo, buscou-se avaliar o efeito da modificação genética e da aplicação do glifosato, usado no controle de plantas daninhas, sobre a variabilidade de estirpes de rizóbio durante o cultivo da soja BRS 244RR e BRS 154 em área de um Planossolo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado, na safra 2005/2006, em campo experimental do Centro Agropecuário da Palma (CAP) da Universidade Federal de Pelotas, localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da

área experimental é classificado como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico. Como material vegetal foram utilizadas sementes de soja da cultivar BRS 244 RR fornecidas pela Embrapa-Trigo (Passo Fundo).

O plantio foi realizado durante a primeira quinzena de dezembro de 2005, com sementes previamente tratadas com fungicida Derosal Plus® e inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587.

Os tratamentos realizados foram: T1 - soja BRS 244 RR sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias após o plantio (dap); T2- soja BRS 154 sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dap; T3 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 dap; T4 - soja BRS 244 RR com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 e 56 dap; T5 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de herbicida Imazetapir a 100g ia ha⁻¹, aos 28 dap e, T6- soja BRS 154 com uma aplicação de herbicida Imazetapir a 100g ia ha⁻¹, aos 28 dap.

Aos 60 dias após o plantio, correspondendo ao estágio R3 do desenvolvimento da soja, foi retirada uma planta por unidade experimental para avaliação da microbiota simbiote.

Para o isolamento das estirpes, seguiu-se o método de ZILLI et. al., 1998 e após, o DNA foi extraído conforme o protocolo adotado por XAVIER et al. (2004).

Para a análise de agrupamento, dos isolados de rizóbio, foi usado o software NTSYS utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson e o método de distância de matriz (UPGMA) para elaboração do dendrograma. Para identificação das estirpes de *Bradyrhizobium Elkanii* e *B. Japonicum*, utilizadas como inoculante no cultivo da soja, foi utilizado o programa Genebank- BLAST – nucleotide blast para obter a seqüência do DNA dessas estirpes e o programa Vector NTI 10.0.1 Invitrogen corporation® para simular a digestão com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente com as amostras do experimento.

3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

A utilização da técnica Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) para análise da variabilidade de estirpes de rizóbio mostrou-se sensível e capaz de evidenciar diferenças relacionadas ao tratamento da soja com ou sem herbicidas (Figuras 2 e 3).

Com a utilização dessa técnica foi possível obter nove perfis distintos de rizóbio conforme podemos visualizar no dendrograma da figura 1. Mais detalhadamente, pode-se verificar a presença de dois grupos distintos que apresentam em torno de 60% de similaridade, os quais foram identificados com auxílio do software (Vector NTI 10.0.1) como sendo de *Bradyrhizobium elkanii* (587) e *Bradyrhizobium japonicum* (5079), as quais estavam presentes no inoculante utilizado. No dendrograma podemos verificar num extremo um grande número de representantes do perfil A, que estão presentes em todos os tratamentos testados, sendo, portanto uma estirpe de rizóbio resistente aos tratamentos. Entre os outros perfis obtidos, o perfil B não apareceu nos tratamentos T4, T5 e T6 o que pode estar relacionado ao efeito negativo do glifosato e do imazetapir sobre *Bradyrhizobium*. Os perfis E e F apareceram apenas no tratamento T1. Outros perfis como o H e D parecem não estar relacionados com os tratamentos realizados (Quadro 1). Efeitos negativos do glifosato sobre o crescimento ou inibição das estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum*, também foram observados por ZABLOTOWICZ & REDDY (2004) e MALTY et al. (2006).

Com esses dados podemos verificar que aplicações de glifosato ou imazetapir

durante o cultivo de soja GM_{RR} ou NM tem efeito negativo sobre estirpes de rizóbio, porém até esse momento, não foi verificado nenhum resultado negativo relacionado com a modificação genética da planta.

4. CONCLUSÃO

O cultivo da soja geneticamente modificada (GM_{RR}) BRS 244RR, em área de Planossolo, com uso do glifosato ou imazetapir no controle de plantas concorrentes, apresenta forte indicativo de redução na variabilidade de estirpes de rizóbio.

5. REFERÊNCIAS

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: **WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment.** Dordrecht: Springer, p.25-42, 2005.

MALTY, J.S.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, 2006.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. *Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas.* Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).

ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal Environmental Quality**, Madison, v.33, p.825–831, 2004.

ZILLI, J. E.; ALMEIDA, D. L. de; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. *Levantamento da Biodiversidade de Rizóbio em Diferentes Áreas de um Sistema Integrado de Produção Agroecológica.* Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 1998 15p.

6. AGRADECIMENTOS

À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de soja, ao Centro Agropecuário da Palma pelo apoio na instalação do experimento e ao IFSul pela Bolsa de Iniciação Científica.

Quadro 1- Perfis de agrupamento dos representantes de rizóbio obtidos no experimento com soja GM_{RR} BRS 244 RR e NM BRS 154, cultivada em Planossolo, no CAP na safra de 2005/2006.

T1 A B C E F	T2 A B C D	T3 A B C
T4 A C G H	T5 A C	T6 A D

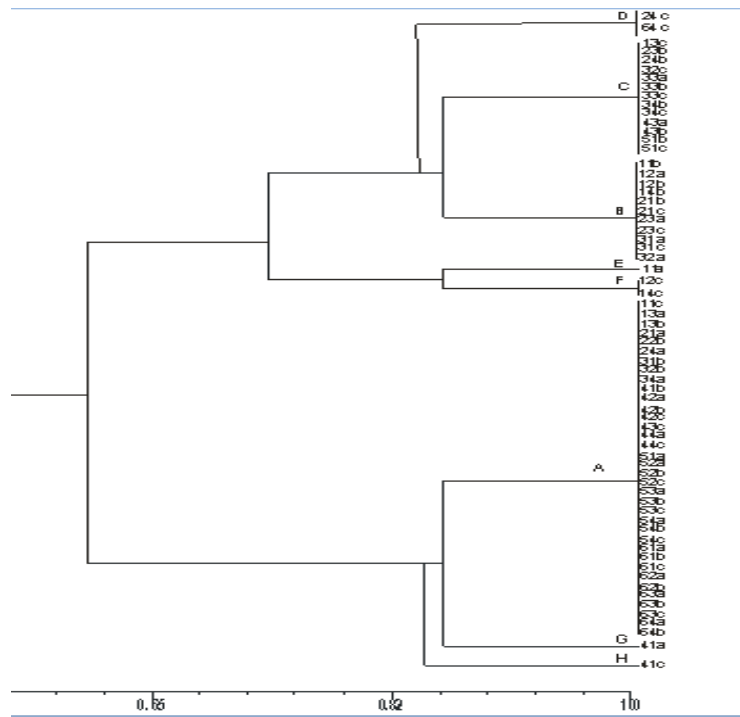


Figura 1- Dendrograma do agrupamento dos padrões obtidos pela digestão das amostras com as enzimas *Hinf* I, *Hha* I e *Hae* III com a utilização do software NTSYS utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson e o método de distância de matriz (UPGMA).

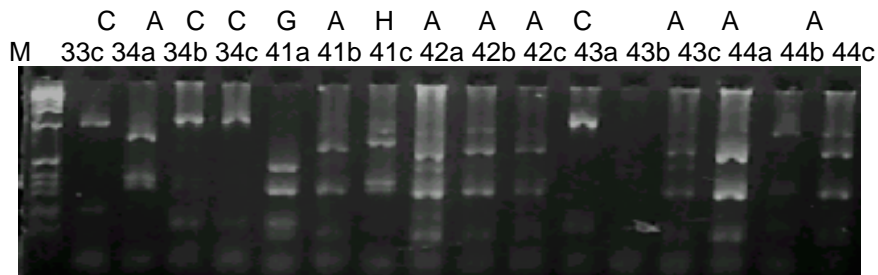


Figura 2- Perfil de bandas obtidos por amostras de rizóbio digeridas com a enzima *Hinf* I e visualizadas em Gel de agarose a 3% em corrida a 80 V por 3h. Sendo M- marcador 1kb ladder, A, C, G e H perfis obtidos pelas diferenças de padrão de bandas.

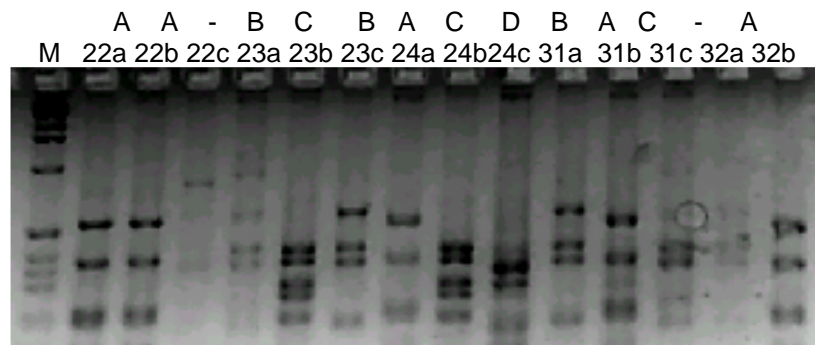


Figura 3- Perfil de bandas obtidos por amostras de rizóbio digeridas com a enzima *Hha* I e visualizadas em Gel de agarose a 3% em corrida a 80 V por 3h. Sendo: M- marcador 1kb ladder; A, B, C e D perfis obtidos pelas diferenças de padrão de banda.

