

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DETECÇÃO DE ESTIRPES RECOMENDADAS PARA INOCULAÇÃO DA SOJA  
EM NÓDULO, SOLO E INOCULANTES COMERCIAIS.**

Thaís de Lima Cabral  
Dissertação

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DE SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DETECÇÃO DE ESTIRPES RECOMENDADAS PARA INOCULAÇÃO DA SOJA  
EM NÓDULO, SOLO E INOCULANTES COMERCIAIS**

Thaís de Lima Cabral  
Engenheira-Agrônoma (UFRGS)

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Mestre em Ciência do solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Julho de 2012

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO  
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

THAÍS DE LIMA CABRAL  
Engenheira Agrônoma (UFRGS)

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para a obtenção do Grau de

### **MESTRE EM CIÊNCIA DO SOLO**

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
Por

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ  
Professor Orientador  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

ALBERTO VASCONCELLOS INDA  
JUNIOR  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO  
PPG-Ciência do Solo/UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

BENJAMIN DIAS OSÓRIO FILHO  
UERGS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, professor Enilson Luiz Saccol de Sá, que foi um grande incentivador para que eu concluísse este trabalho. Seu auxílio e compreensão foram fundamentais nessa caminhada. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação.

À minha família, que é o que eu tenho de mais importante nessa vida, agradeço pelo simples fato de poder ter vocês ao meu lado. Em especial ao meu pai, Antônio Tadeu de Mello Cabral, que é um exemplo de superação e vida para todos da nossa família. À Minha mãe, Cleonir de Lima Cabral, pelo amor e carinho. Aos meus irmãos Márcia e Luís Fernando. Amo todos vocês.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS, Leandro Hann, Rafael Goulart Machado, Raquel Garibaldi Damasceno, William Rosa da Silva, Márcio Silveira, Marcos Strochein, Gleidson Reiff, Neemias da Silva Santos, Bruno César da Costa e Suélen de Aguiar Oldra pelo companheirismo e apoio. Em especial à colega Manuela Bruxel, que foi minha companheira de trabalho e com quem eu aprendi muito.

Ao Enrique, meu noivo, pelo apoio e companheirismo. Te amo.

A UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, e aos professores que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas da EMATER/RS-ASCAR, em especial aos colegas do escritório municipal de Morrinhos do Sul.

Ao CNPq e ao MAPA pelo auxílio financeiro.

# DETECÇÃO DE ESTIRPES RECOMENDADAS PARA INOCULAÇÃO DA SOJA EM NÓDULO, SOLO E INOCULANTES COMERCIAIS. <sup>1/</sup>

Autor: Thaís de Lima Cabral

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

A inoculação de rizóbios em espécies leguminosas já é bastante conhecida e levou o Brasil a um avanço na produção de soja. Para garantir a qualidade desses produtos inoculantes é necessário o desenvolvimento de metodologias específicas. A detecção das estirpes constantes na embalagem no produto comercial e em solo e planta inoculada é uma forma de fiscalizar a qualidade do produto. Para tanto os objetivos deste trabalho foram detectar a presença das estirpes de bradirizóbios recomendadas para a cultura da soja SEMIA 5079 e 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) e SEMIA 587, 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), que devem estar presentes nas formulações de inoculante comerciais, usando-se a técnica de REP- PCR. Detectar a presença destas estirpes em nódulos de plantas de soja inoculadas e em solo de área cultivada. Foi instalado um experimento com soja em vasos, na casa de vegetação. A soja foi inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium* e com inoculantes comerciais. Os nódulos foram utilizados para a extração de DNA. Também foi realizada extração de DNA de amostras de solo cultivado com soja e de nódulos de soja coletados do campo e de estirpes puras e produto inoculante. As extrações foram realizadas com os Kits: Wizard DNA Purification® (Promega corp., Madison, USA) e Power Soil. Após foi realizada a amplificação do DNA genômico utilizando-se a técnica de REP - PCR com o primer iniciador BOX A1 e com o primer ERIC 1 e ERIC2. O perfil de bandas da amplificação do DNA genômico da mistura de estirpes pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX A possibilitou a diferenciação de produtos contendo misturas de estirpes diferentes. Nas condições deste trabalho, a técnica de amplificação pela PCR com BOXA1 ou ERIC do DNA de nódulos de plantas inoculadas não se mostra adequada para a identificação das estirpes de rizóbios que induziram a formação destes nódulos em plantas de soja cultivada em casa de vegetação. Não ocorreu a amplificação do DNA extraído de amostras de solo cultivado com soja pela reação em cadeia da polimerase com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A e ERIC. A amplificação pela PCR com BOXA1 do DNA extraído de nódulos de plantas cultivadas a campo apresenta baixa similaridade com os obtidos das amostras de produtos inoculantes comerciais utilizados e não permite a identificação da mistura de estirpes que foram inoculadas nas plantas.

Dissertação de mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (42p.). Julho de 2012. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq.

# DETECTION OF RECOMMENDED STRAINS FOR INOCULATION OF THE NODULE SOYBEAN, SOIL AND COMMERCIAL INOCULANTS.<sup>1/</sup>

Author: Thaís de Lima Cabral

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

Inoculation of rhizobia in legume species is very well known and led Brazil to advance in soybean production. To ensure the quality of these inoculant products is necessary to develop specific methodologies. The detection of strains contained in packaging of the commercial product and in soil and plant inoculated is a way to monitor the quality of the product. Therefore the objectives of this study were to detect the presence of “bradirrizóbios” strains recommended for soybean SEMIA 5079 and 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) and SEMIA 587, 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) that must be present in the formulations of commercial inoculant, by using the technique of REP-PCR. To detect the presence of these strains in inoculated nodules of soybean plants into soil and cultivated area, an experiment was set up with soybeans in pots in a greenhouse. Soybeans were inoculated with the strains of *Bradyrhizobium* and commercial inoculants. The nodules were used for DNA extraction. Additionally it was carried out DNA extraction from soil cultivated with soybeans and soybean nodules collected from the field and pure strains and inoculant product. The extractions were performed with the following kits: Wizard DNA Purification® (Promega corp., Madison, USA) and Power Soil. Afterwards was performed the amplification of the genomic DNA using the technique of REP - PCR primer with the starting primer A1 and with the primer ERIC1 and ERIC2. The profile of the bands’ amplification of the genomic DNA from the mixture of strains by PCR with primer ERIC and BOX A allowed to differentiate products containing mixtures of different strains. In this study conditions, the technique of PCR amplification with the BOXA 1 or ERIC of DNA from nodules of inoculated plants, is inadequate for the identification of strains of rhizobia, which induced the formation of nodules on soybean plants grown in greenhouse. It was not observed amplification of DNA extracted from soil samples cultivated with soybeans by PCR with primer BOX A and ERIC. Amplification by PCR with BOXA 1 of the DNA extracted from plants’ nodules grown in a field has low similarity with the product samples obtained from commercial inoculants used and it does not allow the identification of the mixture of strains that were inoculated in the plants.

<sup>1/</sup> M. Sc. dissertation in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (42 p.). July 2012. Financial support by CNPq.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Inoculantes comerciais.....	3
2.2. Legislação para produção e qualidade de inoculantes no Brasil .....	5
2.3. Rizóbios.....	6
2.4. Técnicas de biologia molecular para detecção de rizóbios.....	7
2.5. Classificação de rizóbios que nodulam soja.....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1. Cultivo das estirpes estudadas.....	11
3.2. Obtenção de nódulos de soja cultivada em casa de vegetação.....	12
3.3. Amostras de solo.....	14
3.4. Inoculante comercial utilizado na lavoura de soja.....	14
3.5. Obtenção de nódulos de soja cultivada em campo.....	14
3.6. Métodos para extração de DNA.....	15
3.6.1. Extração com o kit Wizard DNA Purification®.....	15
3.6.2. Extração com o kit Power Soil® DNA isolation.....	16
3.6.3. Quantificação de DNA.....	17
3.7. Amplificação do DNA genômico das estirpes e do DNA extraído dos nódulos de plantas de soja e das amostras de solo.....	18
3.8. Análise dos produtos das amplificações.....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
4.1. Extração de DNA das estirpes puras e de nódulos de soja cultivada em casa de vegetação .....	20
4.2. Amplificação do DNA extraído dos nódulos de plantas de soja cultivadas em casa de vegetação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX.....	21
4.3. Extração de DNA de amostras de solo cultivado com soja.....	25
4.4. Extração de DNA de nódulos de soja cultivada em campo.....	27
4.5. Dendogramas de Similaridade.....	29
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35
<b>7. APÊNDICES</b> .....	40



## RELAÇÃO DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Estirpes autorizadas para produção de inoculantes para soja.....	11
Tabela 2. Composição dos produtos comerciais.....	13

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. DNA genômico extraído das estirpes de <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587 e 5019) e das estirpes de <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) com o uso do Kit Wizard DNA Purification da Promega.....	21
Figura 2. Comparação do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico, extraído das misturas de estirpes e de nódulos radiculares de plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais BOX-PCR.....	22
Figura 3. Comparação do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico, extraído das misturas de estirpes e de nódulos radiculares de plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais, por ERIC-PCR.....	23
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose com DNA extraído de amostras de solo cultivado com soja.....	25
Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por BOX A - PCR de DNA extraídos de amostras de solo cultivado com soja e de produto inoculante comercial.....	26
Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por BOX A - PCR de DNA extraído de nódulos de soja cultivada em campo e de produto inoculante comercial.....	28
Figura 7. Análise de similaridade com índice de <i>Jaccard</i> e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e os nódulos de soja obtidos em casa de vegetação.....	29

Figura 8.	Análise de similaridade com índice de <i>Jaccard</i> e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e os nódulos de soja obtidos em casa de vegetação.....	31
Figura 9.	Análise de similaridade com índice de <i>Jaccard</i> e agrupamento por UPGMA de inoculante comercial e de nódulos de soja obtidos em campo.....	32

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	<b>Página</b>
Apêndice 1. Solução nutritiva (Sarruge, 1975).....	41
Apêndice 2. Meio de cultura Levedura- Manitol (Adaptado de Vicent, 1970).....	42

## 1. INTRODUÇÃO

A inoculação de rizóbios em espécies leguminosas já é bastante conhecida e levou o Brasil a um avanço na produção de soja. Esta técnica também tem contribuído com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados, diminuindo impactos ambientais como a contaminação do lençol freático com substâncias nitrogenadas que são capazes de lixiviar e se deslocar no perfil do solo. Atualmente novos produtos inoculantes têm surgido no mercado internacional e muitas solicitações para registro de produtos inoculantes tem sido efetuadas no Brasil. A quase totalidade destes inoculantes busca utilizar a interação benéfica existente entre plantas e microrganismos simbiotes, endofíticos ou associativos, que possam estimular o desenvolvimento das plantas cultivadas e aumentar a produção de grãos ou a oferta de forragem com elevado teor de proteína e digestibilidade ao rebanho.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da lei 6.894 criada em 16 de dezembro de 1980 dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura. A Portaria nº 340, de 28 de setembro de 2009, (MAPA, 2009) regulamenta o controle de qualidade do produto comercial, prevendo metodologias específicas a serem realizadas pelos laboratórios certificados pelo MAPA. A Instrução Normativa nº13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011), regulamenta a produção dos inoculantes, garantindo qualidade e recomendando estirpes específicas para cada tipo de inoculante. A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO, em Porto Alegre, é a instituição que realiza as análises de qualidade dos inoculantes. Para identificação dos microrganismos presentes nos inoculantes a Portaria nº340/09 sugere a identificação sorológica por aglutinação das estirpes ou como alternativa, recomenda análises de biologia molecular.

Os objetivos deste trabalho foram detectar a presença das estirpes de bradirrizóbios recomendadas para a cultura da soja, SEMIA 5079 e 5080 (*Bradyrizobium japonicum*) e SEMIA 587, 5019 (*Bradyrizobium elkani*), que devem estar presentes nas formulações de inoculante comerciais, usando-se a técnica de REP- PCR. Detectar a presença destas estirpes em nódulos de plantas de soja inoculadas e em solo de área cultivada.

Como o cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre sua diversidade, pois a maioria dos organismos existentes não é facilmente isolada por meio de técnicas de cultivo (Roesch et al., 2007), o presente trabalho utilizou métodos de extração de DNA dos microrganismos diretamente das amostras ambientais

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Inoculantes comerciais

O inoculante consiste de uma cultura de rizóbio previamente selecionada, misturada a um veículo, normalmente turfa. Ao longo das últimas décadas, grande parte dos inoculantes comercializados no Brasil utiliza a turfa como veículo e, ainda hoje este veículo é considerado adequado, porque além de possibilitar a manutenção de elevado número de bactérias viáveis, oferece proteção física contra as adversidades do solo (Lupwayi *et al.*, 2005) . Os inoculantes turfosos são vendidos no Brasil desde a década de 1950 (Freire; Verneti, 1999). Já os inoculantes com formulações líquidas se destacam para a cultura da soja, uma vez que são adequados a aplicação em grandes áreas por facilitar a semeadura mecanizada (Lupwayi *et al.*, 2005). O inoculante líquido é composto por um substrato estéril, podendo ser produzido e esterilizado na própria indústria. Por possuir natureza fluida, a adesão dos microrganismos e a aplicação em sementes ou no campo torna-se facilitada. No entanto, a sobrevivência de bactérias nesse tipo de inoculante e nas sementes inoculadas é dificultada porque as bactérias não estão tão protegidas do estresse ambiental (Singleton *et al.*, 2002; Tittabutr *et al.*, 2007).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não restringe a utilização de nenhum material como veículo de inoculante no Brasil, desde que o mesmo seja capaz de atender as determinações do MAPA. Sendo assim, a oferta de inoculantes no mercado brasileiro é bastante variada em relação ao suporte utilizado, podendo ser líquido, turfoso, gel ou liofilizado. Segundo Keyser (1992), os fatores que caracterizam um suporte adequado são a facilidade de obtenção e esterilização (autoclave ou radiação), manutenção da infectividade e efetividade das estirpes inoculadas durante o período de estocagem e ausência de toxicidade aos seres humanos, animais e plantas.

Problemas com a qualidade dos inoculantes comerciais têm sido freqüentes e podem ser atribuídos ao uso de turfa não esterilizada e ao baixo teor de matéria orgânica presente (Vargas e Hungria, 1997).

A RELARE - Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de Rhizobium – realizou o primeiro fórum para definir inoculantes e técnicas de inoculação no ano de 1985. Neste fórum, destacou-se a discussão e definição dos mecanismos de recomendação de estirpes para o uso de inoculantes brasileiros (RELARE, 1985). Atualmente a coleção SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - (FEPAGRO) é responsável, desde então, pela manutenção e distribuição das estirpes utilizadas comercialmente no país. Estas estirpes são reconhecidas como as mais eficientes para as respectivas culturas recomendadas, representando um reservatório valioso de bactérias e genes de grande valor biotecnológico (Comunicado técnico EMBRAPA).

A produção de inoculantes com estirpes de rizóbios no mercado brasileiro é uma das maiores do mundo, sendo comercializadas mais de 23 milhões de doses por ano, das quais mais de 95% são destinadas para a cultura da soja e aproximadamente 4% para cultura do feijoeiro (Chueire et al., 2003). O país possui legislação específica que regulamenta a produção, comercialização e importação de inoculantes. Na cultura da soja a inoculação é prática adotada há longa data. Atribui-se à fixação biológica de nitrogênio a viabilidade econômica dessa leguminosa, pois, embora demande muito nitrogênio em razão do elevado teor protéico de seus grãos, a simbiose rizóbio-leguminosa torna desnecessário o emprego de adubação nitrogenada. A redução da aplicação de nitrogênio no solo diminui a contaminação dos recursos hídricos, principalmente com nitrato, sendo a inoculação com microrganismos fixadores de nitrogênio positiva, tanto no aspecto econômico como no ambiental.

Recentemente novos produtos inoculantes de gramíneas estão sendo lançados, como inoculantes para milho, cana-de-açúcar e trigo. Os inoculantes para a cultura do milho e trigo contêm a bactéria *Azospirillum brasiliense* que é capaz de realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio e de promover o crescimento das plantas, pela produção de diversos hormônios vegetais que



resultam em um maior crescimento das raízes e, conseqüentemente, em maior absorção de água e nutrientes.

## **2.2- Legislação para produção e qualidade de inoculantes no Brasil**

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o responsável pela inspeção, fiscalização da produção, importação, exportação e comércio de inoculantes no Brasil. Em sua instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011), estabelece que os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas devam conter concentração mínima de  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, até a data de vencimento, de tal forma que esta concentração equivale à quantidade de inoculante que deve ser misturada a 50Kg de sementes de soja para proporcionar, no mínimo, 600.000 células bacterianas viáveis por sementes. Os inoculantes devem ser elaborados com suporte estéril e estarem livres de microrganismos não especificados até o fator de diluição  $10^{-5}$ , o suporte pode ser sólido ou fluido e ter um prazo de validade mínimo de 6 meses a contar da data de fabricação; e devem conter pelo menos duas estirpes, podendo essas estarem em diferentes combinações.

O inoculante necessita apresentar uma alta concentração de células viáveis para que ocorra uma boa colonização da raiz. Para isso, são imprescindíveis uma estirpe eficiente e um ótimo veículo de inoculação. O número de bactérias deve ser o maior possível no momento da colonização, e para que isso ocorra, é necessário que o inoculante forneça um alto número de rizóbios viáveis ou utilize-se uma maior dosagem para compensar as perdas entre a inoculação da semente e a nodulação efetiva. (Brockwell, 1995; Schuh, 2005).

A Portaria 340, de 01 de outubro de 2009, estabelece as metodologias oficiais para controle de qualidade de inoculantes. O artigo 17º propõe que os microrganismos presentes no produto inoculante sejam identificados através de métodos sorológicos por aglutinação (Vicent, 1970). O artigo 19º sugere, como alternativa a utilização de *rep*-PCR (amplificação de sequências repetitivas no

genoma), e recomenda que sejam utilizadas colônias puras ou crescidas em meio líquido.

A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) é a instituição responsável pelo controle de qualidade dos inoculantes produzidos e importados pelo Brasil. Este controle de qualidade abrange as análises de riqueza dos inoculantes com contagem de concentração mínima de  $10^9$  células viáveis através do crescimento em meio Levedura-Manitol (Vicent, 1970) pelo método de Espalhamento em Superfície (Spread Plate), análise de contaminantes até diluição de  $10^5$  e identificação dos microrganismos presentes dentro do produto comercial através de sorologia.

A sorologia têm sido utilizada para caracterizar os rizóbios, pois os mesmos apresentam grande heterogeneidade antigênica, o que possibilita a separação dessas bactérias em tipos antigênicos distintos (Lemos, 1994). As quatro estirpes recomendadas para produção de inoculantes de soja possuem antígenos e antissoro correspondente para cada estirpe (Mendes et al., 2000), todavia, não existe um antígeno específico para cada estirpe e conseqüentemente um antissoro correspondente. Outro problema encontrado acontece quando as estirpes não reagem com os soros testados (Hungria, 1994; Bangel, 2000). As técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais utilizadas devido a estes problemas e também a sua eficiência e praticidade.

### **2.3 - Rizóbios**

Bactérias que habitam as raízes de plantas são denominadas rizobactérias, podendo ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal em benéficas, deletérias ou neutras (Dobbelaere et al., 2003). As que exercem efeitos benéficos são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. Os efeitos positivos podem ocorrer por influência direta ou indireta. Por influência direta pode-se citar o aumento de solubilização e entrada de nutrientes ou produção de reguladores de crescimento vegetal e por influência indireta a supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos (Asghar et al., 2002).

As bactérias diazotróficas, devido à sua habilidade em converter o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), que pode ser utilizada pela

planta, são consideradas promotoras de crescimento vegetal. A Fixação biológica de nitrogênio, através da simbiose rizóbio- leguminosa é uma forma eficiente e barata de suprir as necessidades de nitrogênio para as culturas.

Segundo Evans & Burris (1992), de acordo com a relação que as bactérias diazotróficas estabelecem com as plantas, podem ser classificadas em três grupos: bactérias de vida livre, que fixam nitrogênio para seu próprio uso; bactérias associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem formar estruturas vegetativas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; e bactérias simbióticas, que estabelecem uma relação muito estreita com a planta, sendo na maioria dos casos formadas estruturas vegetativas diferenciadas denominadas nódulos.

As bactérias que estabelecem relações simbióticas com as leguminosas são denominadas rizóbios. Apesar da relação simbiótica rizóbio-leguminosa ser consagrada, estes microrganismos também podem, por outros mecanismos, estimular o crescimento e o desenvolvimento de plantas de outras famílias além das leguminosas. Durante a associação entre rizóbio- leguminosa, a bactéria induz a planta a desenvolver um novo órgão, o nódulo. A formação dessa estrutura depende de um reconhecimento específico entre a bactéria e a planta hospedeira, ocasionando a invasão dos rizóbios no tecido vegetal.

#### **2.4 - Técnicas de biologia molecular para detecção de rizóbios**

A identificação e a caracterização taxonômica dos rizóbios baseavam-se tradicionalmente nos resultados de especificidade por hospedeiros, análise da morfologia de colônias em meio de cultura, resistência intrínseca a antibióticos, características bioquímicas, suscetibilidade a bacteriófagos, reações sorológicas, particularmente com antígenos termoestáveis, entre outros. Atualmente a identificação de populações microbianas, tanto em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe tem sido possível com a utilização de técnicas baseadas na biologia molecular (Schneider e de Bruijn, 1996).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial na reação que codifica o gene 16S rRNA, considerada

conservada entre as bactérias, mas ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991), até mesmo entre os rizóbios e agrobactérias (Willems & Collins, 1993).

As análises genéticas de organismos sofreram um grande impulso após a descoberta da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction, ou seja, Reação em cadeia da polimerase). Esta técnica permite a amplificação de sequências específicas de DNA, permitindo a detecção de bactérias ao nível de gênero, espécie ou estirpe, dependendo dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados. Uma variação do método de PCR denomina-se REP-PCR, e baseia-se na utilização de *primers* correspondentes a seqüências repetitivas de consenso, dispersas no genoma das eubactérias (Brujin, 1992). A amplificação de seqüências repetitivas intergênicas, conhecidas como ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e elementos BOX, geram padrões altamente característicos, quando separadas em gel de agarose (Selenska-Pobell, 1995). O oligonucleotídeo BOX (Versalovic et al., 1994) é uma seqüência de DNA altamente repetitiva e conservada, localizada em regiões intergênicas de *Streptococcus pneumoniae*, próximas a genes envolvidos na virulência ou competência e transformação genética. A dispersão desses fragmentos pode ser indicativa da estrutura e evolução do genoma bacteriano em função da seleção (Martin et al., 1992).

Com a metodologia de REP-PCR é possível obter uma boa discriminação das amostras em nível de estirpe, embora não seja capaz de agrupá-las quanto à espécie ou gênero (Olive & Bean, 1999). Como os *primers* não são específicos para gênero, espécie ou estirpe, a técnica permite que os *primers* generalizados sejam utilizados para comparar diferentes bactérias dentro de uma mesma população.

Perfis moleculares que são característicos de centenas de estirpes de rizóbios, incluindo as estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais foram obtidos utilizando-se a técnica de REP-PCR (Hungria et al., 1998; Santos et al., 1999; Chen et al., 2000). Do mesmo modo, a obtenção de perfis de bactérias diazotróficas endofíticas ou associativas se mostrou

altamente eficiente utilizando-se a análise por REP-PCR (Albino et al., 2006; Torres et al., 2008).

Estirpes de rizóbios também podem ser diferenciadas pela técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, ou seja, Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado). A técnica de AFLP baseia-se na amplificação seletiva, por PCR, de fragmentos de DNA genômico total, gerados pela digestão com enzimas de restrição (Vos et al., 1995; Lin et al., 1996; Olive e Bean, 1999). A AFLP tem sido cada vez mais aplicada para diferenciar linhagens de microrganismos (Huys et al., 2000), inclusive para a diferenciação de bactérias fixadoras de nitrogênio (Gao et al., 2001).

A técnica de REP-PCR tem sido utilizada concomitantemente com a AFLP por alguns autores (Ventura & Zink, 2002). Com essa união é possível aliar a simplicidade e rapidez da REP-PCR na distinção de linhagens bacterianas e nos estudos de diversidade, com a capacidade discriminatória da AFLP (Giongo, 2007).

A técnica RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) é bastante utilizada para caracterizar a variabilidade dos isolados bacterianos, com a amplificação de um gene seguida pelo uso de endonucleases de restrição.

## 2.5 - Classificação de rizóbios que nodulam soja

As bactérias que nodulam a soja eram classificadas como *Rhizobium japonicum* do ano de 1932 até 1980 (Fred et al., 1932; Buchanan, 1980), apesar de apresentarem crescimento lento e reação alcalina em meio de cultura que continha manitol como fonte de carbono, diferindo de um grupo grande de estirpes de rizóbios. A partir de 1982, as bactérias da espécie *R. japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium* (“bradus”, grego, significando lento), que apresentava uma única espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (Buchanan 1980) Jordan, 1982 (Jordan, 1982, 1984). Já a partir da década de 80, vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, conseqüentemente, Kuykendall et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*.

Segundo Lemos, 1994, as quatro estirpes recomendadas para a cultura da soja, foram divididas em dois grupos distintos, SEMIA 5079- SEMIA 5080 e SEMIA 587-SEMIA 5019. Esse agrupamento foi feito realizando-se análise de locos enzimáticos múltiplos, sorologia, morfologia de colônia e atividade de hidrogenase por Sato et al.(1999), também por RAPD. Outro estudo, onde foi realizada a análise genética por hibridização com a sequência 16S rRNA (Rumjanek et al., 1993) indicou que as estirpes SEMIAs 587 e 5019 pertenciam à espécie *B. elkanii*. Já Lunge et al. (1994), pela análise de RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), verificaram que cada estirpe foi posicionada em um grupo distinto, enquanto, pela técnica de RFLP com marcadores *nif* e *nod*, as estirpes foram divididas em dois grupos distintos, SEMIA 5079-SEMIA 5080 e SEMIA 587- SEMIA 5019.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Cultivo das estirpes estudadas

As estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais foram obtidas da Coleção de Cultura de rizóbios (Seção de Microbiologia – SEMIA) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil. Posteriormente, foram mantidas no laboratório de Microbiologia Agrícola e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no departamento de Ciências dos Solos. As estirpes SEMIA utilizadas são classificadas na tabela 1 de acordo com a respectiva cultura agrícola, conforme instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011).

**TABELA 1.** Estirpes autorizadas para produção de inoculantes para soja

<b>Cultura Agrícola</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Estirpe (SEMIA)</b>	<b>Gênero/Espécie</b>	<b>Acesso Genbank*</b>
<i>Glycine max</i>	Soja	5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	AF234888
		5080	<i>B. japonicum</i>	AF234889
		587	<i>B. elkanii</i>	AF234890
		5019	<i>B. elkanii</i>	-

\* Tabela adaptada da Instrução Normativa nº13, 24 de março de 2011

Apesar da estirpe SEMIA 5019 constar na lista, a mesma não foi utilizada neste trabalho, devido à dificuldade de encontrar inoculantes comerciais contendo esta estirpe.

As estirpes foram crescidas em placas de Petri com meio LM sólido (Levedura - Manitol – Ágar) (Vicent, 1970) e corante vermelho congo, em estufa a 28°C, por 7 dias.

Para manutenção no banco de estirpes, as mesmas foram mantidas em meio líquido LM e glicerol 50% e armazenadas no ultra-freezer (ULT Freezer, Thermo Electron Corporation, USA), a -80°C.

As estirpes foram inoculadas em meio líquido LM em tubos erlenmeyer e colocadas no incubador orbital (H300 - Cientec equipamentos para laboratório, Piracicaba, Brasil) por 48h, a 28°C e sob agitação a 12.000 rpm para posteriormente realizar a extração de DNA.

### **3.2- Obtenção de nódulos de soja cultivada em casa de vegetação**

Para a obtenção dos nódulos foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando vasos contendo substrato, composto pela mistura de vermiculita e areia (2:1), esterilizado em autoclave a 120°C por 45 minutos.

Sementes de soja da cultivar Don Mario 5.8 i foram desinfestadas com lavagens sucessivas em álcool 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio (0,3 %) por 60 segundos e com água destilada esterilizada por 7 vezes. Foram semeadas três sementes por vaso. Foram realizados 7 tratamentos com 4 repetições, sendo composto por 7 inoculantes comerciais diferentes, sendo 6 destes inoculantes líquidos e 1 líquido –turfoso, os mesmos encontram-se descritos na tabela 2. Os inoculantes continham as misturas de estirpes SEMIA 5079 e 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) e 5079 e 587 (*Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*). Foi inoculado 1 mL do inoculante por vaso. Os vasos foram irrigados com solução nutritiva isenta de nitrogênio (Sarruge, 1975), sendo sua composição conforme segue no apêndice na tabela 7.1. Após 40 dias de cultivo, as plantas foram colhidas e os nódulos foram removidos das raízes e desinfestados com álcool 70% por 45 segundos, seguido de sua imersão em hipoclorito de sódio por 30 segundos e 7 lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Todos os procedimentos de desinfestação foram realizados em câmara de fluxo laminar. Após, os nódulos foram armazenados em tubos de microcentrífuga, sob temperatura de -20°C para extração do DNA.



TABELA 2. Composição dos produtos comerciais

ID *	Natureza	SEMIA	Riqueza (células/mL)	composição declarada**
INL 1	Líquido	5080 5079	$6 \times 10^9$	A base de água.
INL 2	Líquido	5080 5079	$5 \times 10^9$	Fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, fosfato diamônico, cloreto férrico, sulfato de manganês, glicerina, extrato de levedura, água destilada CSP.
INL 3	Líquido	5080 5079	$3 \times 10^9$	Líquido aquoso.
INL 4	Líquido	5079 587	$5 \times 10^9$	Substrato estéril a base de sacarose, proteína hidrolisada, fornecedores de micronutrientes, fosfato monopotássico, hidróxido de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e água.
INL 5	Líquido	5079 587	$5 \times 10^9$	Água destilada, glicerol, glicose, polímeros, dispersante.
INL 6	Líquido	5079 587	$5 \times 10^9$	Água destilada, glicerol, glicose, polímeros, dispersante.
INLT	Líquido Turfosos	5080 5079	$5 \times 10^9$	Fosfato dipotássico, Sulfato de magnésio; Cloreto de sódio, nitrato de potássio, fosfato diamônico, cloreto férrico, sulfato de manganês, glicerina, extrato de levedura, Turfa/suporte; água destilada CSP.

\* ID - Identificação

\*\* Composição de acordo com o rótulo do produto comercial

### **3.3 - Amostras de solo**

Foram coletadas amostras de solo de uma área cultivada com soja no município de Machadinho – RS, sendo obtidas 10 amostras de solo na profundidade de 0 a 10 cm. Destas 10 amostras, 8 foram retiradas da região da linha de semeadura, onde encontravam-se as raízes de soja e 2 amostras foram obtidas da entrelinha de semeadura da soja. O solo foi armazenado em temperatura de 4°C até as análises posteriores.

Foi realizado REP-PCR das amostras de solo, utilizando como oligonucleotídeo iniciador o BOX A1.

### **3.4 - Inoculante comercial utilizado na lavoura de soja**

Foi realizada extração de DNA de inoculante comercial utilizado na lavoura de soja de onde foram retiradas as amostras de solo para extração de DNA. O Inoculante era de formulação líquida para a cultura da soja, contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*), concentração de  $5 \times 10^9$  células/mL e composição conforme segue a relação da matéria prima/função: Água/ solvente, suporte; Extrato de levedura/ Fonte de nitrogênio; Glicerol, carboximetilcelulose e gelatina/ Fonte de carbono; Fosfato monopotássico, fosfato monoamônico (MAP), cloreto de sódio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio/ Fonte mineral.

Foi realizado REP-PCR, utilizando como oligonucleotídeo iniciador o BOX A1.

### **3.5 - Obtenção de nódulos de soja cultivada em campo**

No dia 07/01/2012 foram coletadas plantas de soja que se encontravam entre o estágio vegetativo V3- V4, de uma área cultivada na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, município de Eldorado do Sul, RS. Ao total foram coletadas 24 plantas. Os nódulos de cada planta foram removidos com auxílio de uma pinça e conservados em frascos contendo sílica para sua conservação. Os nódulos foram desinfestados com lavagens em álcool 70% por 60 segundos, seguido de sua imersão em hipoclorito de sódio por igual período e realizando-se o enxágüe com água destilada esterilizada por 7

vezes. Após os mesmos foram reidratados, imergindo-os em água destilada esterilizada. Cada nódulo foi macerado individualmente em solução salina 0,85 % com auxílio de uma pinça e uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante foi utilizado para realizar a extração do DNA genômico. Os DNAs foram caracterizados pela técnica de REP-PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX A1.

### **3.6 - Métodos para extração de DNA**

A extração de DNA das estirpes puras isoladas e das contidas no inoculante comercial e em nódulos de soja obtidos em casa de vegetação e a campo e também de amostras de solo foi realizada utilizando-se Kits de extração de DNA.

Para a extração de DNA das estirpes padrão, uma alíquota de 1,5mL da suspensão contendo as células crescidas em tubos de erlenmeyer foi transferida a um tubo de microcentrífuga, centrifugadas a 14.000 rpm por 2min, para formar *pellet* de células. Para o inoculante líquido, o procedimento foi semelhante, entretanto uma alíquota de 1,5mL foi retirada do produto comercial, e posteriormente da mesma forma, centrifugou-se a 14.000 rpm por 2min, para a formação de *pellet* de células.

Para extração do DNA dos nódulos de plantas de soja, cultivadas em casa de vegetação em substrato estéril e de nódulos coletados do campo, os mesmos foram macerados individualmente em tubos de microcentrífuga contendo solução salina 0,85% estéril e, após um pulso em centrifuga, foi retirada do sobrenadante uma alíquota de 1,5 mL que foi utilizada para realizar a extração de DNA. A extração de DNA das amostras de solo foram realizadas conforme a recomendação do Kit de extração utilizado.

Após estas etapas para a formação dos *pellets*, os mesmos foram utilizados para as distintas extrações de DNA

#### **3.6.1 - Extração com kit Wizard DNA Purification®**

Utilizou-se este Kit para realizar as extrações das estirpes puras, inoculante comercial e nódulos de soja.

A extração de DNA foi realizada conforme instruções do kit Wizard DNA Purification® (Promega corp., Madison, USA), ressuspendendo-se os *pellets* em 600µL da solução “Nuclei Lysis Solution” e incubando-se a 80°C por 5min em banho seco (Dryblock- BS20, Cambridge, Inglaterra). Após as amostras esfriarem até a temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) foram adicionados 3µL de “RNAse Solution” e incubou-se novamente, entretanto, a 37° por 1h. Adicionou-se 200 µL de “Protein Precipitation Solution” e agitou-se em *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 20s. Incubou-se as amostras a -20°C por 5 min e em seguida centrifugou-se a 14.000rpm por 3min.

Os sobrenadantes foram transferidos a tubos de microcentrífuga novos onde se adicionou 600µL de isopropanol e mexeu-se gentilmente o tubo até formar massa visível. Centrifugou-se novamente a 14.000rpm por 2min. O sobrenadante foi descartado sobrando somente o *pellet*, que foi lavado com 600µL de etanol 70%, invertendo-se o tubo 4 vezes.

Centrifugou-se a 14.000rpm por 2 min e cuidadosamente o etanol 70% foi aspirado, e deixou-se o *pellet* secar por 20 min à temperatura ambiente. Reidratou-se o DNA com 100µL da solução “DNA Rehydration Solution”. As amostras de DNA foram estocadas na geladeira, a aproximadamente 4°C.

### **3.6.2 - Extração com kit Power Soil®DNA isolation**

A extração das amostras de solo foi realizada conforme especificações do fabricante do kit Power Soil® DNA isolation (MO Bio, Carlsbad, CA), de maneira que pesou-se 0,25 g de solo e adicionou-se ao microtubo *Glass Bead* de 2 mL. Adicionou-se 750 µL da *solução de beads* ao microtubo já contendo o inoculante.

Os microtubos foram agitados no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 10s, e adicionou-se 60 µL de *Solução C1* a 60°C, e inverteu-se manualmente o microtubo 20 vezes. Posteriormente, os microtubos foram agitados em *vortex* horizontal adaptado (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 10min, a velocidade máxima.

Os microtubos foram centrifugados por 14.000rpm por 30 segundos e posteriormente foram transferidos 500µL de sobrenadante para um novo

microtubo, fornecido pelo kit. Adicionou-se 250µL da *Solução C2* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s. Incubou-se a 4° C por 5 min.

Centrifugou-se por 1 min a 14.000rpm e transferiu-se 500µL do sobrenadante a um novo microtubo, e posteriormente adicionou-se 200µL da *Solução C3* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s. Incubou-se novamente a 4°C por 5min.

Os microtubos foram centrifugados por 1 min a 14.000rpm e transferiu-se 750 µL do sobrenadane para um novo microtubo, onde adicionou-se 1,2mL da *Solução C4* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s. Adicionou-se 675µL da solução recém agitada no microtubo contendo uma coluna de sílica acoplado e centrifugou-se por 1min, a 14.000rpm. Este procedimento foi realizado três vezes, e logo após adicionou-se 500 µL da *Solução C5* e centrifugou-se por 30s a 14.000rpm.

Transferiu-se a coluna de silica para um novo microtubo e adicionou-se 100µL da *Solução C6* no centro da coluna e centrifugou-se os microtubos por 40s a 14.000rpm. Descartou-se a coluna de sílica.

As amostras de DNA foram estocadas na geladeira, a aproximadamente 4°C.

### **3.6.3 - Quantificação de DNA**

Todas os DNA foram quantificados com o emprego do fluorímetro Qubit® (Invitrogen corp., California, USA), que foi calibrado para quantificar amostras de DNA dupla fita, com fluorescência entre 485 e 530 nm. Uma alíquota de 3µL de DNA extraído de cada amostra foi misturada a 197 µL da solução de trabalho do Qubit® e posteriormente agitada no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 3s.

Deixou-se descansar por 2min a temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente as amostras foram quantificadas no fluorímetro Qubit® (Invitrogen corp., California, USA).

### **3.7- Amplificação do DNA genômico das estirpes e do DNA extraído dos nódulos de plantas de soja, inoculante comercial e das amostras de solo**

Os DNAs obtidos dos nódulos de soja, das estirpes puras, do inoculante comercial e das amostras de solo foram caracterizados pela técnica de REP-PCR que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic et al., 1994), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores :

BOX A1- (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-'3).

Outro oligonucleotídeo iniciador utilizado foi o ERIC, que corresponde à sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (de Versalovic, 1991).

ERIC: F: 5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

R: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC2G-3'

As reações de REP- PCR foram realizadas de acordo com o protocolo de Versalovic et al. (1994) para um volume total de 25 µL, contendo 30 ng de DNA molde, 1U Taq DNA polimerase, Tampão da Taq DNA polimerase 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTPs (Life Technologies) e 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. A reação foi realizada em 32 ciclos, como segue: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 52°C por 1 min; e extensão a 65°C por 8 min; e 1 ciclo de extensão a 65°C por 16 min. As reações foram realizadas em termociclador Thermo Hybaid e os fragmentos foram visualizados em eletroforese a 60V por 2,5h, com gel de agarose 1,5% em cuba horizontal contendo tampão TBE1X. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) e o marcador molecular de 400 pb. A visualização do gel foi realizada em fotodocumentador G2200 da Kodak.

### **3.8 - Análise dos produtos das ampliações**

O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, utilizando-se o programa GelPro Analyser 3.1, onde 0 (zero) indicava a ausência de banda e 1 (um) a presença. A similaridade/dissimilaridade genética entre os isolados foi medida pelo coeficiente de Jaccard (i,j) que não considera as similaridades negativas.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

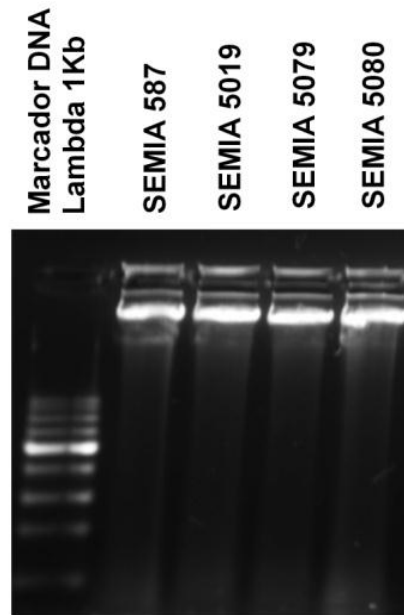
Foram realizadas diversas extrações de DNA de amostras de culturas puras das estirpes utilizadas em inoculantes comerciais para soja e de nódulos e amostras de solo de áreas sob cultivo de soja. Observou-se que a extração de DNA de amostras de nódulos e solo, apresentam uma série de dificuldades como a presença de contaminantes e dificuldades para se obter uma quantidade adequada de DNA para possibilitar as análises por PCR ou outras técnicas de biologia molecular.

### **4.1- Extração de DNA das estirpes puras e de nódulos de soja cultivada em casa de vegetação**

O método de extração de DNA com o uso do Kit Wizard DNA Purification da Promega possibilitou a obtenção de quantidade adequada de DNA sem a presença de contaminantes químicos tanto das estirpes (Figura 1) como de nódulos radiculares de plantas de soja cultivadas em condições de casa de vegetação. A utilização do Kit permitiu a obtenção de adequada quantidade de DNA de forma rápida sem maiores dificuldades técnicas. Estas características são importantes quando se deseja a utilização de métodos de extração de DNA em análises de rotina, como as que são necessárias nas análises de qualidade de produtos inoculantes comerciais. Bruxel (2012) (dados não publicados) realizou experimentos comparando diferentes métodos de extração de DNA e observou que a extração de DNA de estirpes puras foi mais eficiente com o emprego do Kit.



No entanto, para a extração de DNA de produtos inoculantes turfosos, nenhuma das metodologias estudadas conseguiu extrair DNA livre de contaminantes químicos e atribuiu isso à natureza do próprio suporte, a turfa, que é retirada da camada orgânica de solos de turfeiras e, portanto, constituída de substâncias muito diversas.



**Figura 1:** DNA genômico extraído das estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e 5019) e das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) com o uso do Kit Wizard DNA Purification da Promega.

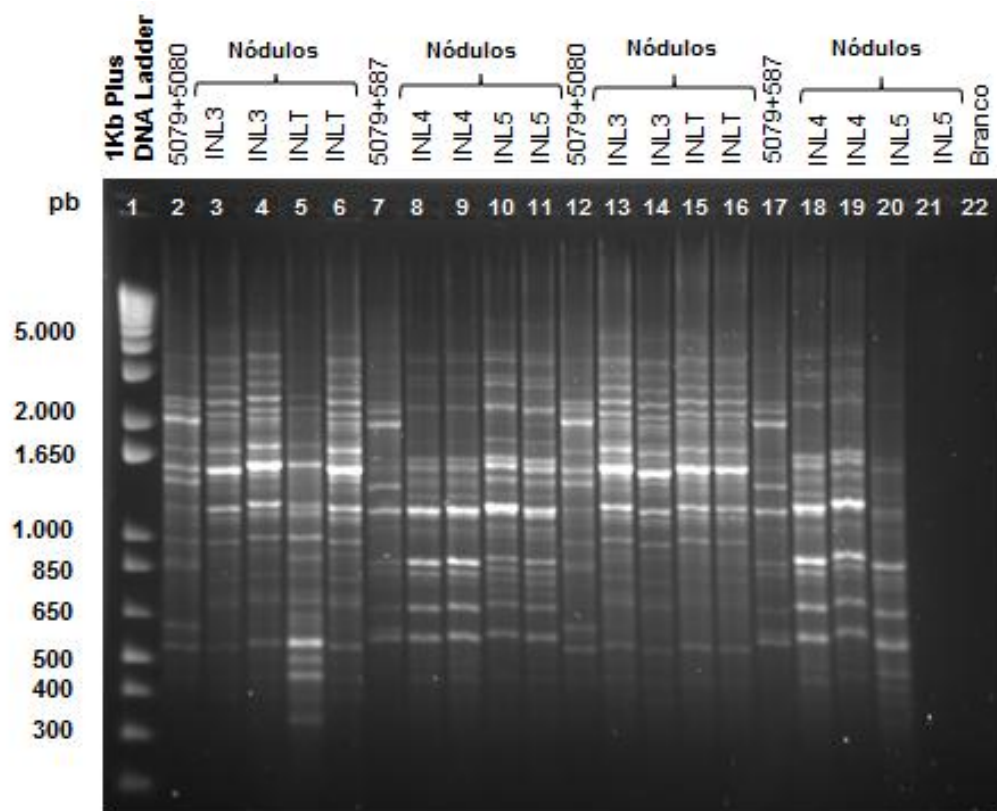
#### **4.2- Amplificação do DNA extraído dos nódulos de plantas de soja cultivadas em casa de vegetação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX**

Na figura 2, são apresentados os perfis eletroforéticos em gel de agarose dos fragmentos da amplificação por PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 do DNA extraído de nódulos de soja cultivada em condições axênicas em casa de vegetação.

Para fins de comparação, realizou-se a amplificação de DNA genômico extraído da mistura de duas estirpes crescidas em meio de cultura LM, na proporção de 1:1 de cada uma. Na figura 2, na primeira canaleta contem o perfil de bandas do marcador de peso molecular de DNA de fago Lambda 1Kb. Nas canaletas 2 e 12 são mostrados os perfis da amplificação do DNA extraído da mistura das culturas puras das estirpes SEMIA 5079 e 5080 crescidas em

laboratório em meio LM. E nas canaletas 7 e 17 são mostrados os perfis da mistura da SEMIA 5079 e 587. Nas demais canaletas subsequentes são mostrados os perfis de bandas da amplificação dos DNAs extraídos de nódulos radiculares das plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais contendo em sua formulação as misturas das mesmas estirpes.

Analisando-se o perfil de bandas (Figura 2) obtidas na amplificação do DNA por BOX – PCR percebe-se que muitas bandas são comuns nos perfil do DNA extraído dos nódulos radiculares das plantas de soja inoculadas com os inoculantes comerciais. Já, comparando o perfil obtido com as estirpes puras com o obtido dos nódulos de soja inoculados com os inoculantes comerciais, apenas algumas bandas são comuns.



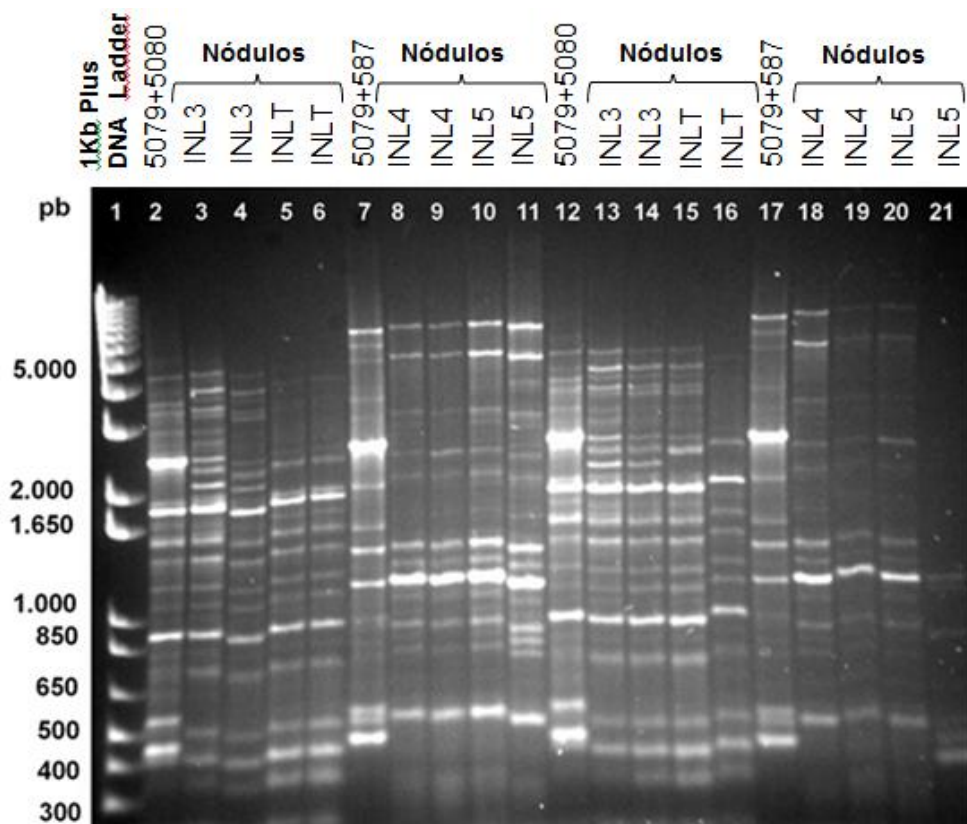
**Figura 2:** Comparação do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico, extraído das misturas de estirpes e de nódulos radiculares de plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais, por BOX-PCR.

Os resultados mostram que no perfil de bandas das amplificações dos DNAs das misturas das estirpes SEMIA 5079 + 5080 as bandas em torno de

1.650 e uma banda de 1.000 pares de bases aparecem também nos perfis da amplificação do DNA dos nódulos de plantas inoculadas com estas misturas de estirpes. Estas bandas parecem ser devidas à amplificação do DNA da estirpe SEMIA 5080, pois não aparecem nos perfis das misturas das estirpes SEMIA 5079 + 587 e nem nos perfis dos nódulos inoculados com esta mistura de estirpes.

Da mesma forma, uma banda de cerca de 650 pares de bases parece estar relacionada à amplificação do DNA da estirpe SEMIA 587, pois é comum no perfil da amplificação do DNA das misturas das estirpes SEMIA 5079 + 587 e nos nódulos inoculados com esta mistura de estirpes.

Na figura 3, são apresentados os perfis eletroforéticos em gel de agarose dos fragmentos da amplificação por PCR com o oligonucleotídeo iniciador ERIC do DNA extraído de nódulos de soja cultivada em condições axênicas em casa de vegetação.



**Figura 3:** Comparação do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico, extraído das misturas de estirpes e de nódulos radiculares de plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais, por ERIC-PCR.

Para fins de comparação, da mesma forma como foi feito para a análise da amplificação com o BOX A-PCR, realizou-se a amplificação de DNA genômico extraído da mistura de duas estirpes crescidas em meio de cultura LM, na proporção de 1:1 de cada uma. Na figura 3, a primeira canaleta contém o perfil de bandas do marcador de peso molecular de DNA de fago Lambda 1Kb. Nas canaletas 2 e 12 são mostrados os perfis da amplificação do DNA extraído da mistura das culturas puras das estirpes SEMIA 5079 e 5080 crescidas em laboratório em meio LM. E nas canaletas 7 e 17 são mostrados os perfis da mistura da SEMIA 5079 e 587. Nas demais canaletas subsequentes são mostrados os perfis de bandas da amplificação dos DNAs extraídos de nódulos radiculares das plantas de soja inoculadas com inoculantes comerciais contendo em sua formulação as misturas das mesmas estirpes.

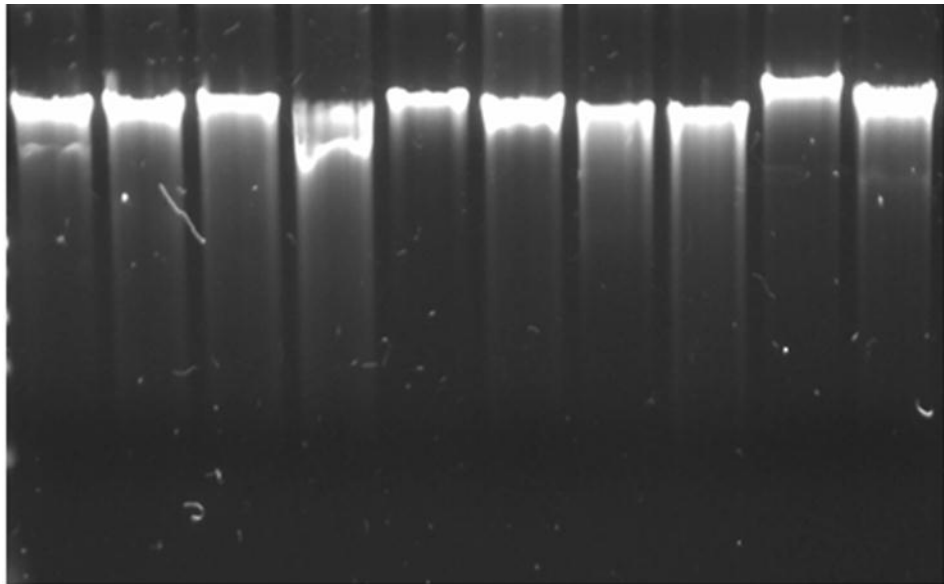
Observando-se os perfis eletroforéticos mostrados na figura 3 nota-se que a utilização do oligonucleotídeo iniciador ERIC proporcionou uma maior semelhança entre os perfis das amplificações do DNA da mistura das estirpes puras com o obtido dos nódulos de soja produzidos pela inoculação com os produtos inoculantes comerciais.

No entanto, nota-se que dois fragmentos com tamanhos entre 1000 e 1650 pares de bases aparecem apenas nos perfis das amplificações do DNA das misturas das estirpes SEMIA 5079 + 587 e nos nódulos de plantas inoculadas com essa mistura de estirpes. Também pode ser observado que um fragmento com tamanho entre 850 e 1000 pares de bases aparece apenas nos perfis da amplificação do DNA das misturas das estirpes SEMIA 5079 + 5080 e nos nódulos radiculares das plantas inoculadas com essa mistura de estirpes.

Os resultados mostram que a análise do perfil eletroforético da amplificação do DNA das misturas de estirpes e dos nódulos de plantas inoculadas com estas misturas em condições axênicas por BOX A-PCR e ERIC-PCR podem ser úteis na identificação das misturas de estirpes que estão nos nódulos de plantas em condições axênicas. No entanto, não foi possível se caracterizar uma única estirpe individualmente na análise do perfil de bandas da amplificação do DNA dos nódulos de plantas inoculadas com produtos inoculantes com mistura de estirpes.

#### 4.3- Extração de DNA de amostras de solo cultivado com soja e de inoculante comercial utilizado na lavoura

Na figura 4 é mostrada a eletroforese de DNA extraído de amostras de solo de área cultivada com soja. Observa-se na figura 4 uma certa quantidade de arraste no DNA, podendo o mesmo ser devido a presença de impurezas químicas mesmo no DNA extraído do solo com o emprego do Kit Power Soil, seguindo-se o protocolo recomendado. Seria possível a realização de mais uma etapa de purificação do DNA, embora esse procedimento não tenha sido realizado neste trabalho.

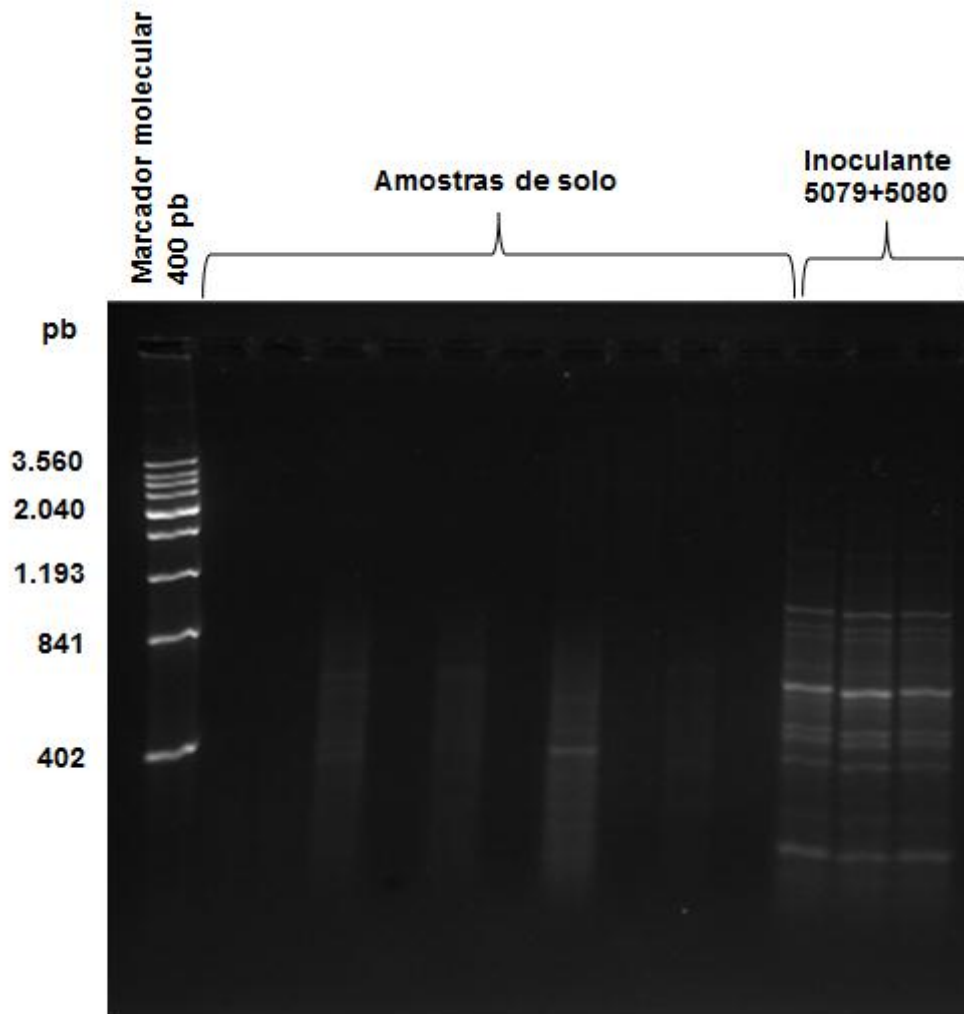


**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose com DNA extraído de amostras de solo cultivado com soja.

Para avaliação da qualidade do DNA extraído do solo, realizaram-se reações de amplificação do DNA PCR usando-se os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX A1 e também de amplificações do DNA extraído de amostras de produto inoculante. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Nenhum resultado foi obtido nas amplificações com ERIC-PCR.

No entanto as amplificações com BOX A-PCR, cujos perfis de bandas são mostrados na figura 5, apresentaram resultados satisfatórios apenas para as amostras de DNA extraídas do produto inoculante comercial, sendo que as

três últimas canaletas apresentam perfis eletroforéticos idênticos para as três repetições de inoculante comercial utilizado na lavoura de soja de onde foram coletadas as amostras de solo. Nas amostras com DNA extraído do solo, as amplificações não foram satisfatórias, sendo que não ocorreu a amplificação do DNA.



**Figura 5:** Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por BOX A1 - PCR de DNA extraídos de amostras de solo cultivado com soja e de produto inoculante comercial.

Falhas na amplificação do DNA por PCR já foram observadas em outros trabalhos. A falta de amplificação, provavelmente se deve à presença de contaminantes químicos. Os contaminantes mais comuns das amostras ambientais são polissacarídeos, polifenóis ou ácidos húmicos e fúlvicos, de maneira que a presença dos mesmos pode reduzir ou até inibir a atividade da

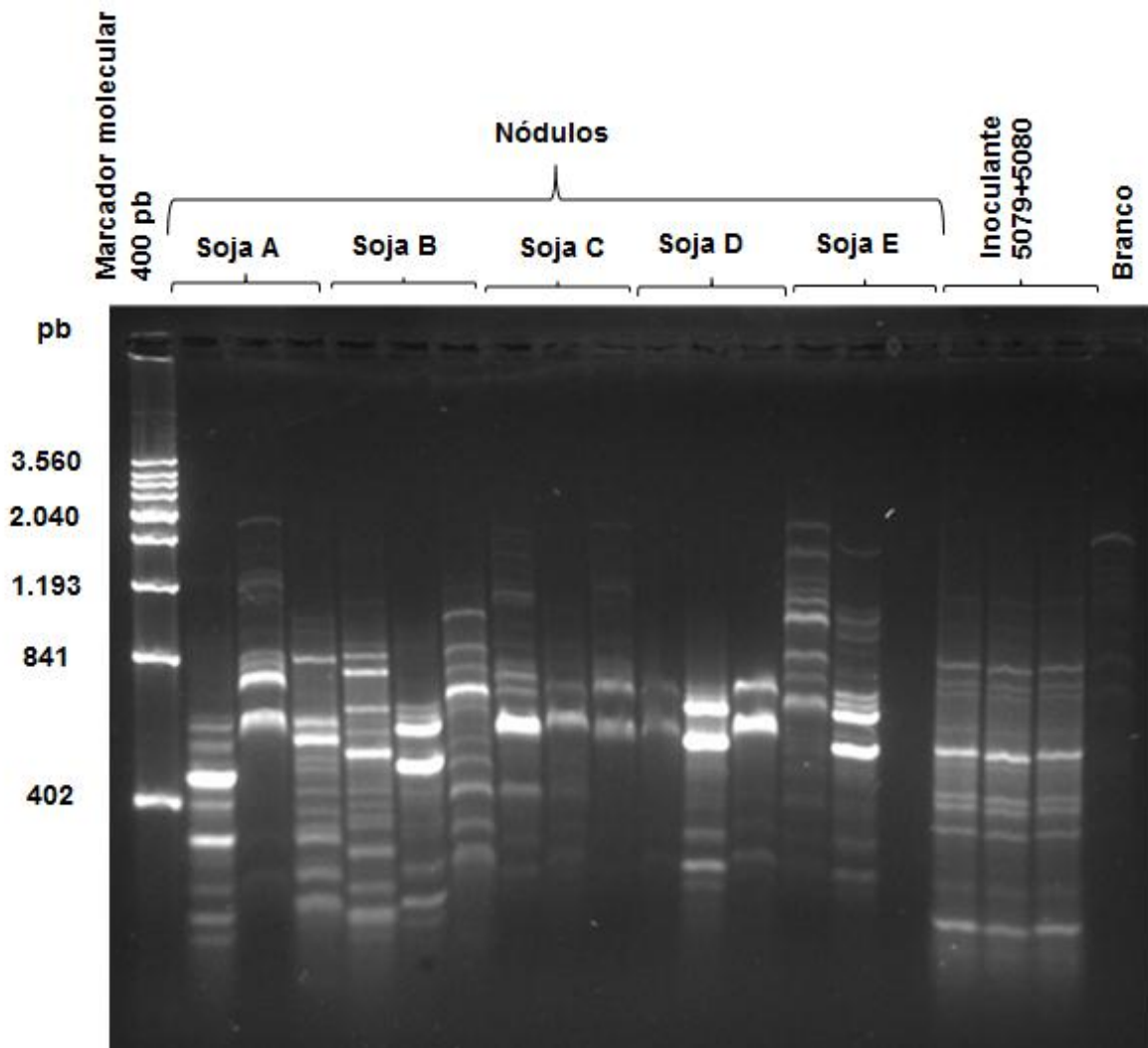
DNA polimerase, e amostras com altos níveis de polissacarídeos aumentam a viscosidade e podem produzir interferências nas análises moleculares (Fang et al., 1992; Han et al., 2010; Nunes et al., 2011). A presença de ácido húmico também pode ter sido o responsável, pois o mesmo desnatura o DNA pela ligação de seus grupos fenólicos a amidas ou por serem oxidados e formarem quinonas que se ligam covalentemente ao DNA (Robe et al, 2003). A enzima Taq polimerase é sensível ao ácido húmico e também a outros inibidores encontrados no solo, podendo a inibição desta inviabilizar ampliações via PCR (Whitehouse & Hottel, 2006).

#### **4.4- Extração de DNA de nódulos de soja cultivada em campo**

Na figura 6, são apresentados os perfis eletroforéticos em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA extraído de nódulos de soja cultivada em campo, na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, utilizando-se a PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A. Na figura 6, os perfis denominados de: Soja A, B, C, D e E correspondem aos perfis obtidos de nódulos retirados de plantas diferentes.

De cada planta foram retirados três nódulos, sendo realizada a extração de DNA de cada nódulo individualmente e a respectiva amplificação com BOX A - PCR. Nas últimas três canaletas são mostrados os perfis resultantes da amplificação de DNA extraído de produto inoculante comercial utilizado para a cultura da soja, contendo a mistura das estirpes SEMIA 5079 e 5080.

Observa-se na Figura 6, que as amostras de DNA extraídas de nódulos de soja cultivadas a campo, ou seja, cultivadas em condições ambientais muito diferentes das condições axênicas em que foram cultivadas as plantas de soja na casa de vegetação, possibilitaram a amplificação com BOX A PCR. No entanto, diferentemente do que foi observado no perfil de bandas das ampliações do DNA de nódulos de plantas inoculadas em condições axênicas (Figura 2) observaram-se poucas semelhanças nos perfis de banda.



**Figura 6:** Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por BOX A - PCR de DNA extraído de nódulos de soja cultivada em campo e de produto inoculante comercial.

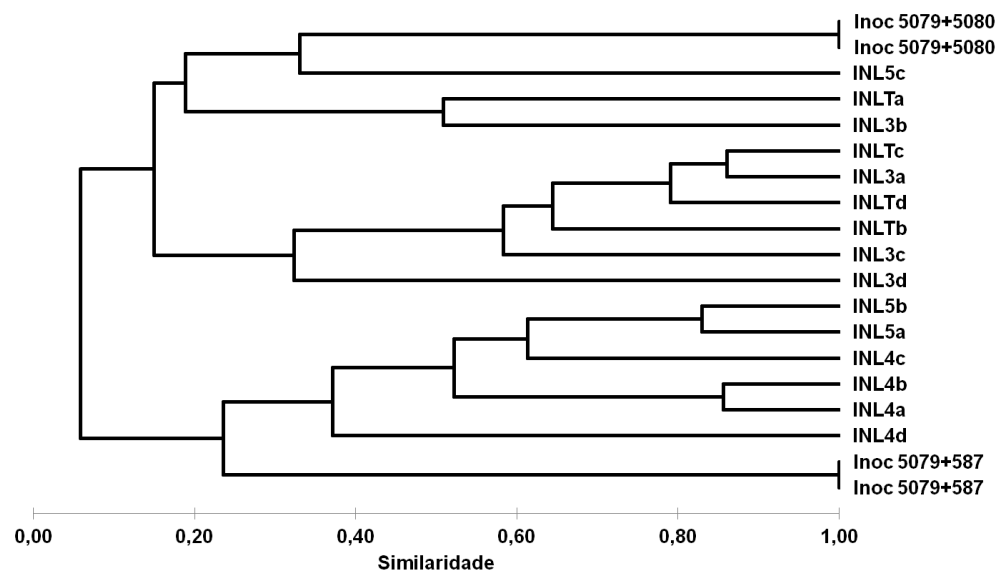
Observa-se na figura 6 que os perfis de bandas das amplificações com BOX A – PCR do DNA das amostras de nódulos do campo apresentaram grande diversidade de bandas. Isso provavelmente se deve à interferência da presença de DNA de organismos rizosféricos que se encontram localizados nos poros e canais no interior dos nódulos ou mesmo de rizóbios nativos que podem ter originado a nodulação destas plantas. A mistura de diferentes genomas pode ter causado o mascaramento do perfil de bandas das estirpes que estavam no inoculante utilizado e que deveriam estar presentes nos nódulos das plantas inoculadas com esse produto.



O perfil eletroforético do inoculante comercial foi idêntico para as três repetições, mas não mostrou semelhança com outros perfis obtidos dos nódulos de soja obtidos no campo.

#### 4.5 - Dendrogramas de Similaridade

Foram produzidos dendrogramas de similaridade dos perfis de bandas do DNA amplificado por BOX-PCR do DNA extraído de nódulos de plantas de soja cultivadas em condições axênicas em casa de vegetação e inoculadas com produtos inoculantes (figura 7).



**FIGURA 7.** Análise de similaridade usando-se o índice de Jaccard e agrupamento por UPGMA do perfil de bandas da amplificação por BOXA1 PCR do DNA extraído de nódulos de soja inoculada, cultivada em casa de vegetação, e de amostras dos produtos inoculantes comerciais utilizados.

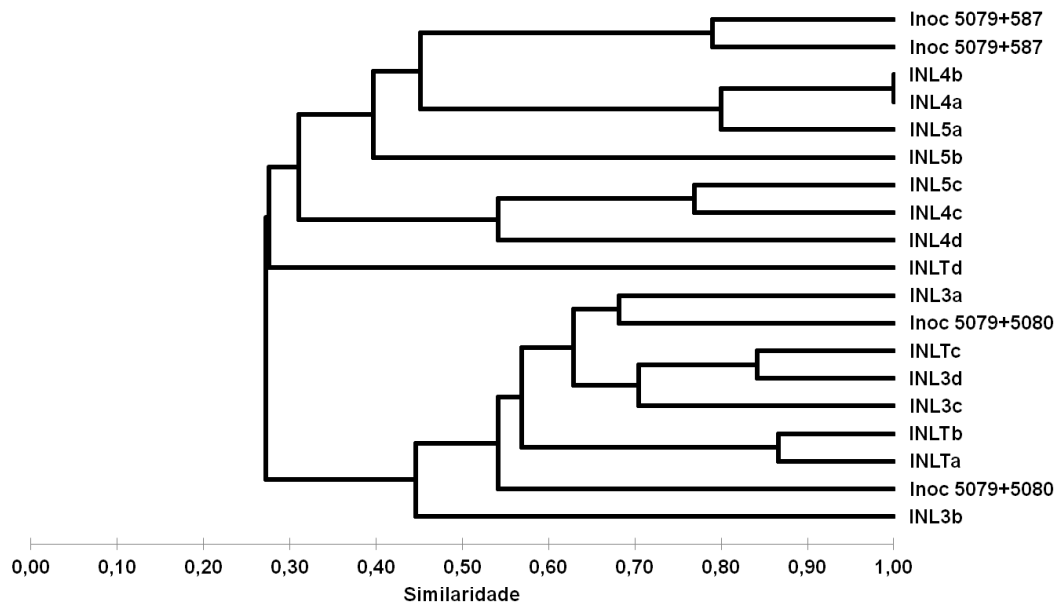
Analisando-se o dendrograma de similaridade das bandas obtidas com a amplificação por BOX A1- PCR (Figura 7), percebe-se a existência de identidade entre os perfis de bandas das amostras de inoculantes comerciais com a mesma mistura de estirpes, tanto no inoculante com SEMIA 5079+5080 quanto no inoculante com SEMIA 5079 + 587. Observou-se baixa similaridade também entre os perfis de bandas da PCR com BOXA1 (Figura 7) dos nódulos INL3a, INL3b, INL3c, INL3d, INL5a, INL5b, INL5c, INL5d e os perfis das

amostras do inoculante contendo a mistura das estirpes SEMIA 5079+5080, que foi utilizado para inocular as plantas, de onde foram retirados tais nódulos, e que foram cultivadas em condições de casa de vegetação. Baixa similaridade também foi observada entre os perfis de bandas dos nódulos (INL4a, INL4b, INL4c, INL4d, INL5a, INL5b e INL5c) de plantas inoculadas com produtos contendo a mistura das estirpes SEMIA 5079 + 587 e das amostras do próprio inoculante

Também se pode observar similaridade acima de 80% entre os perfis obtidos com a amplificação do DNA extraído dos nódulos INL3a com INLTc, INL4a e INL4b e entre INL3a e INLTc. No entanto, observou-se baixa similaridade, abaixo de 40%, entre os perfis de bandas das amostras inoculantes e o obtido dos nódulos de plantas inoculadas com os mesmos inoculantes. Esperava-se que o perfil de bandas da PCR com BOXA1 do DNA extraído dos nódulos de plantas inoculadas apresentaria maior similaridade com o perfil obtido das amostras do inoculante que foi aplicado sobre as plantas. No entanto, isso não foi observado no dendrograma de similaridade do perfil de bandas da amplificação do DNA pela PCR com BOXA1(Figura 7) realizado nas condições deste trabalho.

Na figura 8 é apresentado o dendrograma de similaridade do perfil de bandas do DNA, extraído de nódulos de plantas inoculadas, cultivadas em casa de vegetação, e de amostras dos produtos inoculantes utilizados, amplificados por ERIC-PCR.

Ao contrário do que foi observado no dendrograma de similaridade obtido com a amplificação pela PCR com BOXA1 (Figura 7) do DNA, extraído de nódulos de plantas inoculadas em casa de vegetação, no dendrograma da similaridade dos perfis de bandas obtidos com ERIC-PCR (Figura 8) percebe-se baixa similaridade entre os perfis das amostras de inoculantes comerciais com a mesma mistura de estirpes. Para as amostras do inoculante com SEMIA 5079+5080 observou-se cerca de 55% de similaridade enquanto que para as amostras do inoculante com SEMIA 5079 + 587 a similaridade observada foi em torno de 80%.



**FIGURA 8.** Análise de similaridade usando-se o índice de *Jaccard* e agrupamento por UPGMA do perfil de bandas da amplificação por ERIC PCR do DNA extraído de nódulos de soja inoculada, cultivada em casa de vegetação, e de amostras dos produtos inoculantes comerciais utilizados.

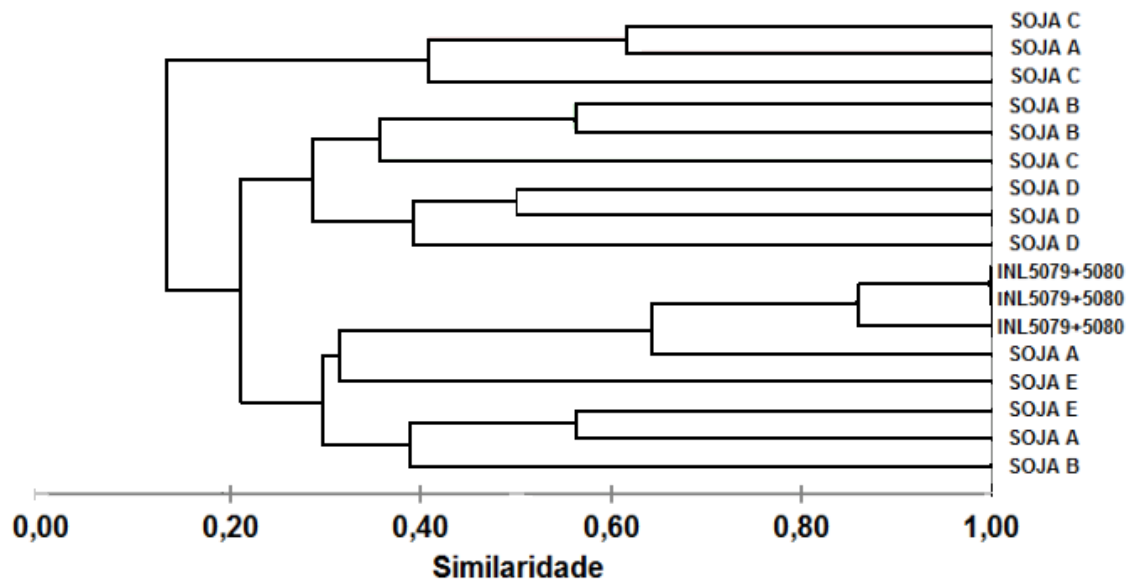
Observa-se, também, na figura 8 que os perfis de bandas obtido de nódulos de plantas inoculadas com o produto contendo a mistura de estirpes SEMIA 5079+5080 apresentaram de 45 a 69% de similaridade com as amostras do produto inoculante utilizado na inoculação das plantas, exceto o perfil do nódulo INLTd que apresentou menos de 30% de similaridade.

A similaridade observada entre os perfis obtidos pela PCR com ERIC do DNA de nódulos de plantas inoculadas com a mistura das estirpes SEMIA 5079+5080 com o obtido das amostras dos produtos inoculantes contendo esta mistura de estirpes foi ainda menor, variando de 30 a 45%.

Nas condições deste trabalho, observa-se que mesmo em condições de casa de vegetação, tanto a amplificação pela PCR com BOXA1 quanto por ERIC do DNA extraído de nódulos de plantas inoculadas apresentou baixa similaridade com o perfil obtido para amostras dos produtos inoculantes utilizados no experimento. Os resultados indicam que, nas condições deste trabalho, a técnica de amplificação do DNA pela PCR com BOXA1 ou ERIC não se mostrara adequadas para a identificação das estirpes de rizóbios que

induziram a formação destes nódulos em plantas de soja cultivada em casa de vegetação.

Na figura 9 é mostrado o dendrograma de similaridade dos perfis obtidos pela amplificação pela PCR com BOXA1 do DNA extraído de nódulos de plantas de soja inoculadas e cultivadas em condições de campo.



**FIGURA 9.** Análise de similaridade usando-se o índice de Jaccard e agrupamento por UPGMA do perfil de bandas da amplificação por BOXA1 PCR do DNA extraído de nódulos de soja inoculada, cultivada em campo, e de amostras dos produtos inoculantes comerciais utilizados.

Na figura 9 se pode observar que a similaridade do perfil de bandas obtido pela amplificação pela PCR com BOXA1 do DNA extraído de amostras de produto comercial contendo a mistura de estirpes SEMIA 5079+5080 variou de 85% a 100%. No entanto, observa-se que a similaridade com as amostras do inoculante utilizado no experimento dos perfis de bandas obtidos da maioria dos nódulos das plantas inoculadas foi muito baixa (20%), enquanto que os perfis obtidos de cinco nódulos apresentaram similaridade variando de 30 a 60%.

Observa-se também que mesmo entre nódulos retirados da mesma planta a similaridade dos perfis de bandas foi muito baixa. Provavelmente isto

se deve ao fato de que DNA de microrganismos rizosféricos pode ter sido extraído junto e mascarado o resultado da amplificação pela PCR com BOXA1.

Os dados indicam que, nas condições deste trabalho, a técnica de amplificação do DNA pela PCR com BOXA1 não foi eficiente na identificação das estirpes de inoculantes utilizados para formação de nódulos em plantas de soja inoculadas e cultivadas a campo.

## **5. CONCLUSÕES**

1 – O perfil de bandas da amplificação do DNA genômico da mistura de estirpes pela reação em cadeia da polimerase com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX A possibilitou a diferenciação de produtos contendo misturas de estirpes diferentes.

2 - Nas condições deste trabalho, a técnica de amplificação pela PCR com BOXA1 ou ERIC do DNA de nódulos de plantas inoculadas não se mostra adequada para a identificação das estirpes de rizóbios que induziram a formação destes nódulos em plantas de soja cultivada em casa de vegetação.

3 – Não ocorreu a amplificação do DNA extraído de amostras de solo cultivado com soja pela reação em cadeia da polimerase com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A e ERIC nas condições desse estudo.

4 – A amplificação pela PCR com BOXA1 do DNA extraído de nódulos de plantas cultivadas a campo apresenta baixa similaridade com os obtidos das amostras de produtos inoculantes comerciais utilizados e não permite a identificação da mistura de estirpes que foram inoculadas nas plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, U. et al. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, n. 2, p. 199-207, 2006.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.

BANGEL, E. **Caracterização de estirpes SEMIA de Bradyrhizobium spp. Recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 683-697, 1995.

BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 30, p. 225-240, 1980.

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

CHEN, L. S. et al. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5099-5103, 2000.

CHUEIRE, L. M. O. et al. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32 p. (Boletim de pesquisa).

DE BRUJIN, F. J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melioli* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DOBBELAERE, S. et al. Response of Agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, n. 28, p. 871-879, 2003.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 1-42.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, Natick, v. 13, p. 52-54, 1992.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

GAO, J. L. et al. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 155-160, 2001.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 168 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HAN, G.-M. et al. An economic and efficient method for further purification of crude DNA extracted from forest soils. **Journal of Forestry Research**, Colombo, v. 21, p. 246-250, 2010.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p. 9-89.

HUYS, G. et al. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3675-3680, 2000.

JARDIM FREIRE, J. R.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 5, p. 117-126, 1999.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 136-139, 1982.



JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-244.

KEYSER, H. H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: METTING, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Decker, 1992. p. 205-226.

KUYKENDALL, L. D. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 501-505, 1992.

LEMOS, E. G. M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase**. 1994. 108 f. Tese (Doutorado – Livre Docência), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jabotical, 1994.

LIN, J. J.; KUO, J.; MA, J. A PCR- based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p. 3649-3650, 1996.

LUNGE, V. R. et al. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 648-652, 1994.

LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, Binghamton, v. 15, n. 2, p. 289-321, 2005.

MARTIN, R.; HUMBERT, O.; CAMARA, M. A highly conserved repeated DNA element locate in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, p. 3479-3483, 1992.

MENDES, I.; VARGAS, M. A.; HUNGRIA, M. **Estabelecimento de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/B. elkanii e seus efeitos na reinoculação da soja em solos do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 17 p. (Documentos Embrapa, 20).

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3.

NUNES, C. F. et al. Otimização de um método para extração de DNA genômico a partir de folhas de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1383-1389, 2011.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Minireview: principles and applications of method for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

ROBE, P. et al. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 39, p.183-190, 2003.

ROESCH, L. F. W. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1367-1380, 2007.

RUMJANEK, N. G. et al. Common soybean inoculants strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 59, p. 4371-4373, 1993.

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

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n. 3, p. 231-234, 1975.

SATO, M. L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; VAN BERKUN, P. Verification of strains identity in Brazillian soybean inoculants by using the Polymerase Chain Reaction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 387-391, 1999.

SCHNEIDER, M.; BRUIJIN, F. J. de Rep- PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 163-174, 1996.

SCHUH, C. A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SELENSKA-POBELL, S. Direct simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: ACKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; BRUIJIN, F. D. de (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrech: Kluwer Academic, 1995. p. 1-17.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2002. p. 52-66. (ACIAR Proceedings, 109e).

TITABUTR, P. et al. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**, Bangkok, v. 33, p. 69-77, 2007.

TORRES, A. R. et al. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 46, n. 4, p. 373-379, 2008.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: EMBRAPA. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1997. p. 297-360.

VENTURA, M.; ZINK, R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR- based methods and pulsed- field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p. 141-154, 2002.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITEHOUSE, C. A.; HOTTEL, H. E. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Franscissela tutarensis* DNA from spiked soil samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 21, p. 92-96, 2007.

WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 305-313, 1993.

WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

## **7. APÊNDICES**

APÊNDICE 7.1: Solução nutritiva (Sarruge, 1975).

Macronutrientes	Estoque (g.L <sup>-1</sup> )	Solução dos vasos (mL)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	1
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	246,4	2
CaCl <sub>2</sub>	111,1	5
KCl	74,6	5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80	1
FE EDTA	1M	10
<b>Micronutrientes</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	1
ZnCl <sub>2</sub>	0,1	1
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,04	1
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,02	1

Obs: O pH da solução foi ajustado para 6,0.

## APÊNDICE 7.2: Meio de cultura Levedura- Manitol (Adaptado de Vicent, 1970)

Manitol.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Ágar.....	15,0g
Solução de Vermelho Congo*	10mL
Água destilada.....	1000mL

\*0,25g em 100mL de água destilada

Ajustar o pH na faixa entre 6,8- 7,0.