



## Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

RESUMOS EXPANDIDOS

06.00878

Resumos expandidos.

2005

PC - 2006.00878



35645-1

**rapa**

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente  
**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**  
*Roberto Rodrigues*  
Ministro



---

**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO**

*Luiz Carlos Guedes Pinto*

Presidente

*Silvio Crestana*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

*Ernesto Paterniani*

*Hélio Tollini*

Membros

**DIRETORIA-EXECUTIVA**

*Silvio Crestana*

Diretor-Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

Diretores-Executivos

**EMBRAPA SOJA**

*Vania Beatriz Rodrigues Castiglioni*

Chefe Geral

*João Flávio Veloso Silva*

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Norman Neumaier*

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

*Heveraldo Camargo Mello*

Chefe Adjunto de Administração

*Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:*  
*Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja*  
*Caixa Postal 231 - CEP 86 001-970*  
*Telefone (43) 3371 6000 Fax (43) 3371 6100 Londrina, PR*  
*e-mail: sac@cnpso.embrapa.br*

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê de Publicações da Embrapa Soja



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Soja  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-781X  
Dezembro, 2005

# ***Documentos 268***

**Jornada Acadêmica da  
Embrapa Soja**

**Resumos Expandidos**

Londrina, PR  
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral

Caixa Postal 231

86001-970 - Londrina, PR

Fone: (43) 3371-6000 - Fax: 3371-6100

Home page: <http://www.cnpso.embrapa.br>

e-mail (sac): [sac@cnpso.embrapa.br](mailto:sac@cnpso.embrapa.br)

Unidade:	Ar. Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Formecedor:	
N.º OCS:	
Origem:	Processo
N.º Registro:	00878/06

**Comitê de Publicações da Embrapa Soja**

Presidente: *João Flávio Veloso Silva*  
Secretária executiva: *Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*  
Membros: *Alexandre Magno Brighenti dos Santos*  
*Antonio Ricardo Panizzi*  
*Clara Beatriz Hoffmann-Campo*  
*Décio Luiz Gazzoni*  
*George Gardner Brown*  
*Ivan Carlos Corso*  
*Léo Pires Ferreira*  
*Waldir Pereira Dias*  
  
Coordenador de editoração: *Odilón Ferreira Saraiva*  
Normalização bibliográfica: *Ademir Benedito Alves de Lima*  
Editoração eletrônica: *Neide Makiko Furukawa*  
Capa: *Danilo Estevão*

1ª impressão 12/2005; tiragem: 300 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (2005, Londrina, PR). Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2005.

175p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.268)

1. Soja-Pesquisa. 2. Pesquisa agrícola. I. Título.  
II. Série.

CDD 633.34072

© Embrapa 2005



## ***Agradecimento***

Ao Sr. John Bowman, pelo estímulo à área acadêmica e por tornar esta obra possível.

## ***Apresentação***

A Embrapa Soja comemorou, em 2005, 30 anos de atividades. Nessa trajetória, a Instituição e seus parceiros geraram e difundiram inúmeras tecnologias para os sistemas de produção da de soja, girassol e trigo. Além de atuar com enfoque no desenvolvimento sustentável dessas culturas, a Embrapa Soja tem colaborado na formação de estudantes de graduação e pós-graduação, por meio de um programa de estágios que possibilita a presença dinâmica de alunos em vários setores e áreas da Empresa.

As comemorações do aniversário da Embrapa Soja contaram com atividades para seus diversos públicos. Para os estagiários, foi organizada a Jornada Acadêmica, com o objetivo de fortalecer a integração entre a Empresa, os estudantes e a comunidade.

Para participar da Jornada, os estudantes prepararam resumos expandidos sobre as atividades que realizam no estágio, sob orientação de seus professores e de pesquisadores e técnicos da Embrapa Soja. Esses trabalhos também foram apresentados oralmente e em sessão pôster, e obtiveram excelente repercussão junto aos participantes do evento.

Esta publicação reúne os resumos expandidos dos trabalhos apresentados na Jornada Acadêmica. É a comprovação do esforço da Embrapa Soja e dos estudantes para demonstrar a importância de suas tarefas e de seu aprendizado durante o estágio.

Em nome da Embrapa Soja, parabenizamos a todos que participaram do evento apresentando trabalhos, e expressamos aqui reconhecimento e agradecimento aos nossos estagiários, pelas contribuições que têm trazido à Empresa. É principalmente por meio desses estudantes que a Embrapa Soja mantém sua ligação com o meio acadêmico, cuja energia, aliada à curiosidade e à sede de aprendizagem, contribuem para manter um ambiente sempre vivo e interativo.

***João Flávio Veloso Silva***

Chefe Adjunto de Pesquisa & Desenvolvimento  
Embrapa Soja





## Sumário

Efeito de diferentes manejos de solo e de culturas na diversidade genética de rizóbios microssimbiontes da soja. Alan Alves Pereira; Rubens J. Campo; Julio Cezar Franchini; Eleno Torres; Mariangela Hungria. ....	11
Efeito da adubação com enxofre e sulfato de amônio sobre o percevejo castanho, <i>Scaptocoris castanea</i> Perty (Cydnidae), em casa de vegetação. Antônio A. dos Santos; Lenita Jacob Oliveira. ....	17
Marcadores microsátélites associados a cultivares de soja. Camila L. Nunes; Nilson Vieira; Carlos Alberto Arrabal Arias; Ricardo Vilela Abdelnoor; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida. ....	22
Seqüenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de <i>Rhizobium tropici</i> . Daisy Rickli Binde; Ligia Maria de Oliveira Chueire; Ismael Hernandez Lucas; Marisa Fabiana Nicolás; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Luiz de Paula Gonzaga; Esperanza Martinez-Romero; Fernando Gomes Barcellos; Miriam Francisca da Silva; José Eduardo Garcia; Mariangela Hungria. ....	29
Efeito da palha, da umidade e da esterilização do solo na produção de esclerócios de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. Daniele Cortezi; T. Mituti; Ivani O. Negrão Lopes; Alexandre José Cattelan; Paulo Roberto Galerani; Eleno Torres; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida. ...	35
Desenvolvimento tecnológicos do "requeijão" cremoso de soja. Elielma C.X. Colla; Solange A.O. Neves; Vera de Toledo Benassi. ....	40
Efeito antagonista de células e exsudatos de <i>Chromobacterium violaceum</i> contra fungos patogênicos de sementes de soja e contra a lagarta da soja <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). Eriana Serpa Barreto; Rodrigo Masel Capeletti Cioato; Marliton Rocha Barreto; Mariangela Hungria. ....	44
Panorama genômico de <i>Rhizobium tropici</i> estirpe PRF 81 (Semia 4080). Fabiana Gisele da Silva Pinto; Ligia Maria de Oliveira Chueire; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Marisa Fabiana Nicolas; Luiz Gonzaga; Emilene André; Mariangela Hungria. ....	50

Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) em solos dos cerrados. Fabio Plotegher; Iêda Carvalho Mendes; Mariangela Hungria. ....	56
Avaliação da eficiência na fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja e caracterização genotípica e da diversidade de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Fernando Gomes Barcellos; Pâmela Menna; Jesiane Stefânia da Silva Batista; Mariangela Hungria. ....	62
Seleção de substrato artificial para criação de percevejos-pragas da soja. Flávia Augusta Clochet da Silva; Antonio Ricardo Panizzi. ....	68
Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo em Campo Belo do Sul, SC. Glaciela Kaschuk; Julio C.P. Santos; João F. Berton-Junior; Mariangela Hungria. ....	71
Estudos da distribuição de percevejos, na planta de soja. Hellen Cristina Romagnolo Pereira; Beatriz S. Corrêa-Ferreira. ....	77
Diversidade de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> estabelecidas por inoculação em solos dos cerrados. Jesiane Stefânia da Silva Batista; Fernando Gomes Barcellos; Pâmela Menna; Ieda Carvalho Mendes; Mariangela Hungria. ....	81
Análise sensorial descritiva de extratos de soja em pó. Josemeyre Bonifácio da Silva; Ilana Felberg; Sandra Helena P. Ferreira; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi; Soo Young Lee. ....	87
Teste de Elisa para a determinação da ocupação nodular. Giovana Bortoti; Kellen Banhos do Carmo; Alexandre José Cattelan. ....	94
Panorama genômico da estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> CPAC 15, recomendada para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja. Leandro Pereira Godoy; Ligia Maria de Oliveira Chueire; Fernando Gomes Barcellos; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos; Luiz de Paula Gonzaga; Marisa Fabiana Nicolás; Mariangela Hungria. ....	98
Dinâmica da matéria orgânica em vários sistemas de manejo e rotação de culturas em Londrina. Letícia C. Babujia; Thais P. Correa; Rosinei A. Souza; Júlio Cezar Franchini. ....	104

Relações públicas como ferramenta estratégica no relacionamento entre a Embrapa Soja e os seus diversos públicos. Flávia Monti Arone; Ludmila Maia Mendes; Gilceana Soares Moreira Galerani. ....	109
Identificação de QTL associados à fixação biológica do nitrogênio em soja. Maria Aparecida dos Santos; Marisa Fabiana Nicolás; Taila Carolina Santini Vedovati; Mariangela Hungria. ....	113
Biologia da lagarta-da-soja em dieta enriquecida com diferentes concentrações de rutina e genistina. Mariana C. Salvador; Sandra H. Miyakubo; Sérgio Henrique da Silva; Maria Cristina Neves de Oliveira; Clara Beatriz Hoffmann-Campo. ....	118
Uso de marcadores moleculares em soja visando identificar caracteres da fixação biológica do nitrogênio. Michele Asai; Maria Aparecida dos Santos; Marisa Fabiana Nicolás; Mariangela Hungria. ....	123
Análise filogenética de rizóbios, utilizados em inoculantes comerciais brasileiros, com base no seqüenciamento do gene ribossomal 16S. Pâmela Menna; Fernando Gomes Barcellos; Jesiane Stefânia da Silva Batista; Eliane Bangel; Rubens José Campo; Mariangela Hungria. ....	128
Parâmetros microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em sistemas de manejo e rotação de culturas. Rosinei Aparecida de Souza; Letícia Carlos Babujia; Thaís Portantiolo Correa; Eleno Torres; Julio Cezar Franchini; Mariangela Hungria. ....	134
Identificação de um isolado de carlavirus em <i>Arachis pintoi</i> Krap & Greg. Tatiana Mituti; Daniele Cortezi; Camila L. Nunes; Elliot W. Kitajima; Priscila Belintani; José O. Gaspar; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida. ....	140
Distribuição de carbono e estabilidade de agregados em amostras indeformadas de diferentes sistemas de manejo de solo. Thaís P. Correa; Letícia C. Babujia; Rosinei A. Souza; Eleno Torres; Júlio Cezar Franchini. ....	145
Grupos de desenvolvimento humano: uma proposta para a promoção da auto-análise e autogestão na Embrapa Soja. Danieli de Cássia Barreto; Vivian Maria Stabile Fumo; Talita Soares	

Lopes; Camila Lombardi Padovezi; Rosely Jung Pisicchio; Lucila Gazzola. ....	150
Determinação de enzimas de lipoxigenase em soja crua e tratada de cultivares brasileiros. Andreia C. Santana; Wladimir S. Crancianinov; Adriana M. Freitas; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. ....	155
Avaliação do teor de inibidor de tripsina de kunitz e de isoflavonas em grãos de soja germinados da cultivar BRS 213. Wladimir S. Crancianinov; Adriana M. Freitas; Andreia C. Santana; José Marcos Gontijo Mandarino; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. ....	158
Composição química de grãos de soja em estádio R-7 danificados por percevejo da soja. Wladimir S. Crancianinov; Adriana M. Freitas; Andreia C. Santana; José Marcos Gontijo Mandarino; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. ....	162
Composição química de soja verde para consumo como hortaliça. Wladimir S. Crancianinov; Adriana M. Freitas; Cléverson R. Urrutia; Andreia C. Santana; José Marcos Gontijo Mandarino; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. ....	165
Comparação entre dois métodos para a extração de isoflavonas em cultivares de soja. Wladimir S. Crancianinov; Adriana M. Freitas; Andreia C. Santana; José Marcos Gontijo Mandarino; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi. ....	169
Determinação do inibidor de tripsina de kunitz em soja crua e tratada de cultivares brasileiras. Wladimir S. Crancianinov; Andreia C. Santana; Adriana M. Freitas; José Marcos Gontijo Mandarino; Vera de Toledo Benassi. ....	173

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

---

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

### **Introdução**

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

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

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

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

## Material e Métodos

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

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

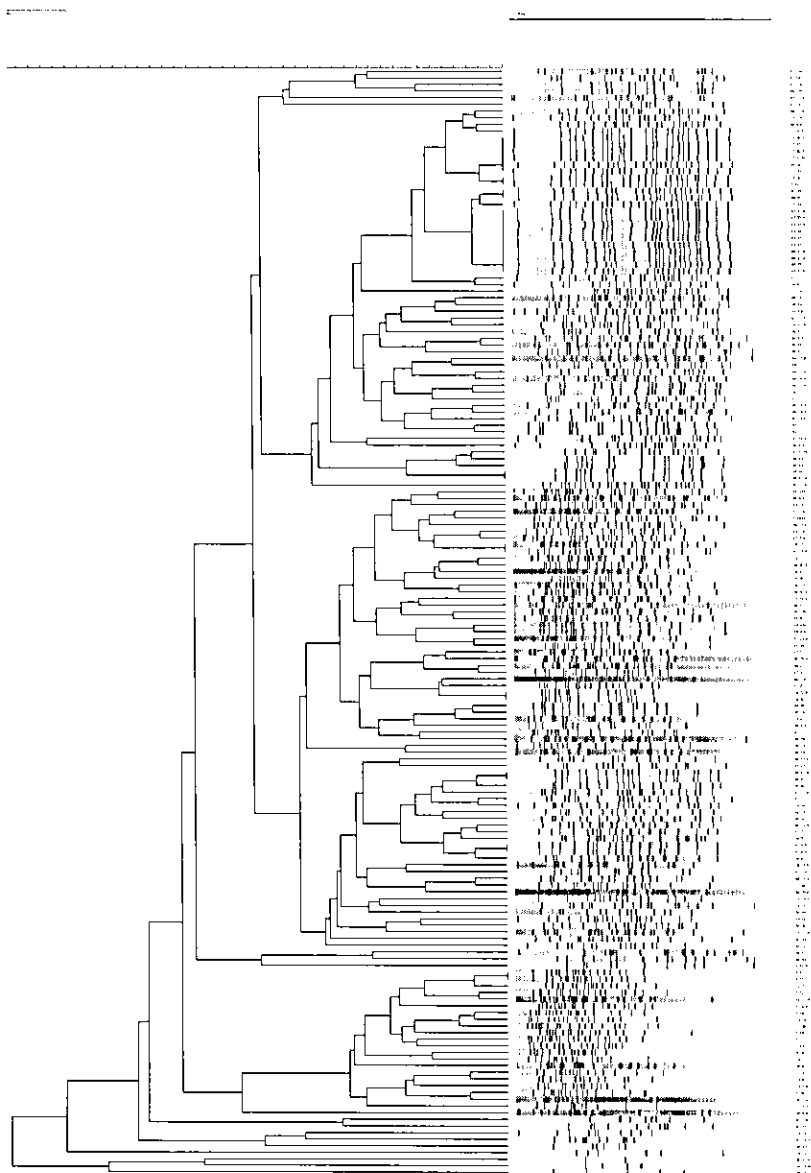
## Resultados

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

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

## Considerações Finais

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



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



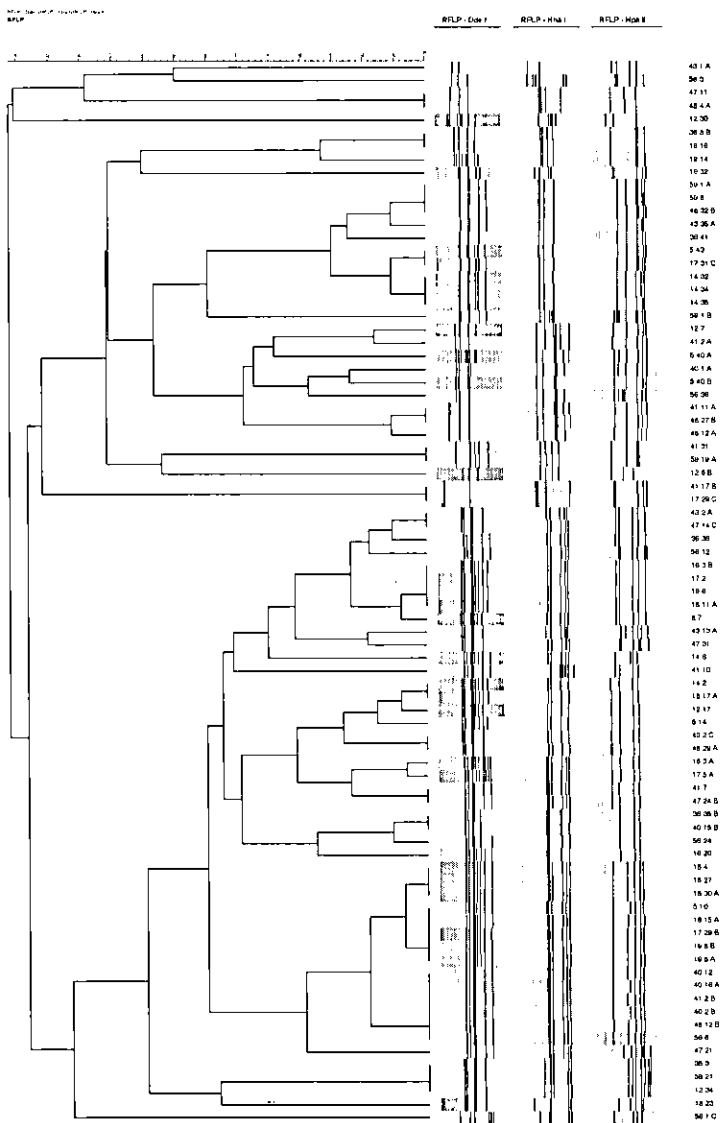


Figura 2. Análise de agrupamento (UPGMA e coeficiente de Jaccard) dos produtos obtidos pela análise de RFLP-PCR da região gênica do 16S rRNA, seguida pelo corte com três enzimas de restrição, de rizóbios isolados de nódulos de soja sob diferentes sistemas de manejo de solo e de culturas.

## Agradecimentos

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

## Referências

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

# **Efeito da adubação com enxofre e sulfato de amônio sobre o percevejo castanho, *Scaptocoris castanea* Perty (Cydnidae), em casa de vegetação**

---

Antônio A. dos Santos<sup>1</sup>; Lenita Jacob Oliveira<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de especialização da Embrapa; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

## **Introdução e Objetivo**

O percevejo castanho das raízes, *Scaptocoris castanea* Perty, é uma praga de hábito subterrâneo que causa grandes prejuízos em lavouras de soja, algodão e pastagens, especialmente nos Cerrados. Observações de campo e registros na literatura mostram que a fertilidade do solo é um dos fatores que podem afetar a intensidade dos danos causados por essa praga. Na literatura, há vários registros sobre efeitos de fertilizantes nitrogenados e enxofre em insetos, com efeitos variáveis conforme a espécie (Malaguido et al. ,1999)

Estudos realizados em campo, por Malaguido et al. (1999), mostraram que o enxofre pode ter um efeito repelente sobre essa praga. Esses autores observaram uma redução na população de percevejos, nas camadas superiores do solo, nas parcelas adubadas com enxofre (50 Kg/ha). Notaram, ainda, que o número de percevejos mortos nessas parcelas foi 3,7 vezes maior do que nas parcelas testemunhas, sugerindo que o efeito direto do adubo sobre a população do percevejo precisa ser melhor investigado em condições controladas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do enxofre e dosulfato de amônio sobre o percevejo castanho, em soja.

## **Materiais e Métodos**

O ensaio foi instalado em vasos, em casa de vegetação. O delineamento

experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições e sete tratamentos: sulfato de amônio (95 Kg /há), três doses de enxofre (25 , 50 e 75 Kg/ha), enxofre +  $K_2O+P_2O_5$  (50+100+100 Kg/ha), uma testemunha adubada somente com  $K_2O+P_2O_5$  (100+100 Kg/ha) e uma testemunha sem qualquer adubação. Cada parcela constou de um vaso adubado com a quantidade de adubo proporcional à dose por hectare, contendo duas plantas. A infestação foi realizada na mesma data da semeadura (21/01/2005), com 10 ninfas do percevejo castanho, coletadas a campo em, Taciba, SP.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, e 21 dias após a infestação, sendo anotadas a altura de cada planta, o comprimento da raiz, e os indivíduos vivos e mortos. Na última avaliação, mediu-se, também, o volume de cada raiz.

## Resultados e Discussão

Como já era esperado, a média de percevejos vivos foi diminuindo ao longo do tempo e, após 21 dias, a sobrevivência variou de 25 a 39%, não havendo, entretanto, diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma das datas de avaliação (Tabela 1). O desenvolvimento das plantas foi semelhante em todos os tratamentos, indicando que a infestação com percevejos não parece ter exercido uma pressão agressora nas plantas. Apenas em relação ao comprimento da raiz, houve diferença significativa entre os tratamentos. As raízes das plantas adubadas apenas com sulfato de amônia foram significativamente mais longas que as das plantas adubadas apenas com fósforo e potássio (Tabela 1). Entretanto, essa diferença, aparentemente, não teve qualquer relação com tolerância da planta ao percevejo castanho.

As condições do ensaio não permitiram avaliar o efeito indireto do adubo sobre a tolerância das plantas ao inseto, uma vez que o nível populacional de percevejos utilizado mostrou-se insuficiente para causar danos a elas, mesmo no solo sem qualquer adubação. Outro aspecto a ser considerado é que, a mortalidade dos insetos sete dias após a infestação, foi alta em todos os tratamentos, variando de 31 a 45%, e

**Tabela 1.** Número de perceijos castanhos vivos e tamanho da planta em vasos com diversos tipos de adubação em casa de vegetação. Janeiro de 2004.

Tratamento	Dose/ha	Nº de perceijos castanhos vivos					Altura da planta (cm)					
		7 DAS <sup>1</sup>	14 DAS	21 DAS	28 DAS	35 DAS	7 DAS	14 DAS	21 DAS	28 DAS	35 DAS	
Testemunha sem adubação		5,7±1,09	4,0±0,99	2,5±0,78	5,4±0,24	10±0,33	11,8±0,47	41,9±1,32ab	3,5±0,37			
Testemunha+PK	100 kg K <sub>2</sub> O+100 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6,7±0,24	5,2±0,76	3,3±0,70	5,1±0,23	9,4±0,34	11,5±0,50	35,9±1,44b	2,9±0,41			
Enxofre+PK	50g S+100 kg K <sub>2</sub> O+100kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6,9±1,17	4,3±1,00	3,3±0,84	5,2±0,20	9,9±0,35	12,1±0,85	33,7±2,95b	2,9±0,35			
Enxofre	25 Kg	5,5±1,01	3,1±0,89	2,5±0,75	5,6±0,27	9,9±0,41	12,5±0,45	42,5±1,97ab	3,8±0,33			
Enxofre	50 Kg	6,4±1,00	5,0±1,15	3,9±1,06	5,4±0,22	9,6±0,32	10,7±0,59	42,5±1,97ab	2,8±0,36			
Enxofre	75 Kg	6,3±1,14	5,2±1,07	3,9±1,03	5,9±1,05	9,7±0,37	12±0,58	40,4±3,25ab	2,8±0,33			
Sulfato de amônio	100 Kg	5,8±1,05	4,8±0,85	3,8±0,81	5,3±0,30	9,5±0,17	11,5±0,57	45,8±2,11a	3,2±0,33			
Valor de F		0,255	0,637	0,504	1,284	0,460	0,845	3,382	1,133			
Prob. de F <sup>2</sup>		0,956 ns	0,70 ns	0,803 ns	0,278 ns	0,835 ns	0,54 ns	0,006 *	0,354 ns			

<sup>1</sup> DAS = dias após a semeadura.<sup>2</sup> Probabilidade de F: ns = não significativo; \* significativo<sup>3</sup> Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

indicando que os percevejos, coletados a campo, já poderiam estar debilitados. Para avaliar o possível efeito da adubação na tolerância da planta aos danos causados por percevejos, será necessário realizar outros ensaios, a campo e em casa de vegetação, com diversos níveis de infestação.

Mesmo considerando a alta mortalidade natural dos percevejos no presente experimento, os resultados indicam que não houve um efeito direto do enxofre sobre os insetos. Em outro ensaio realizado em 2002, também em casa de vegetação (Oliveira et al., dados não publicados), no qual o nível de infestação foi bem mais alto (20 ninfas/vaso com apenas uma planta de soja), observou-se que nenhum dos adubos utilizados (sulfato de amônio, uréia e enxofre) interferiram na mortalidade dos percevejos (Tabela 2). Nesse ensaio, o desenvolvimento das plantas não foi avaliado.

**Tabela 2.** N° de percevejos castanhos mortos em, vasos com soja com diferentes tipos de adubação, em casa de vegetação. Janeiro de 2002

Tratamento	Dose/ha	N° de percevejos castanhos mortos	
		7 DAS <sup>1</sup>	15 DAS
Sulfato de amônio	200 kg	1,10±0,22	1,7±0,26
Enxofre	50 kg	1,80±0,20	2,15±0,17
testemunha	Sem adubação	1,40±0,31	1,85±0,33
Uréia	60 kg	1,35±0,25	1,8±0,21
Valor de F		1,325	0,565
Prob. de F <sup>2</sup>		0,273 <sup>ns</sup>	0,640 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> DAS = dias após a semeadura

<sup>2</sup> Probabilidade de F: ns = não significativo

A análise dos resultados dos dois ensaios (janeiro de 2002 e janeiro de 2004) mostraram que os adubos não apresentam eficiência significativa na relação a mortalidade do percevejo castanho, mas, mesmo assim, ainda são necessários, trabalhos mais refinados, com um número maior de percevejos por tratamento.

## Referências

MALAGUIDO, A.B.; OLIVEIRA, L.J.; LANTMANN, Á. Efeito da adubação química sobre a população do percevejo castanho, *Scaptocoris castanea* Perty (Cydnidae). In: VII REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO, 1999, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FEALQ, 1999.

## Marcadores microsátélites associados a cultivares de soja

---

Camila L. Nunes<sup>1</sup>; Nilson Vieira<sup>2</sup>; Carlos Alberto Arrabal Arias<sup>2</sup>; Ricardo Vilela Abdelnoor<sup>2</sup>; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Estudante de Biologia da UNIFIL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

Nos anos 1960, pesquisadores descobriram que, ao centrifugar DNA, em gradiente de cloreto de céσιο, havia formação de duas bandas. A primeira, contendo moléculas maiores de DNA, e outra, menor, contendo inúmeras moléculas constituídas de longas seqüências repetidas. A banda secundária foi denominada banda satélite e, conseqüentemente o DNA nela presente foi denominado DNA satélite. Jeffreys et al (1985), encontraram outras regiões do DNA, menores que aquelas denominadas satélites, as quais continham seqüências repetidas de 15 ou mais nucleotídeos e que eles denominaram minisatélites. Também determinaram que o número de minisatélites variava entre indivíduos, o que os levou a criar a técnica de "DNA-fingerprinting".

Em 1989, outra importante descoberta aconteceu. Três grupos de pesquisadores (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989; Tautz, 1989), trabalhando independentemente, publicaram a ocorrência de seqüências repetidas no DNA, porém menores que aquelas descritas por Jeffreys et al. (1985). No entanto, entre as três publicações, apenas Litt & Luty denominam a nova descoberta de microsátélites.

Os microsátélites apresentam algumas vantagens no estudo de diversidade genética:

1. especificidade de um *locus* (diferentemente de marcadores multi-*locus* como os minisatélites ou RAPD);
2. são marcadores codominantes (os indivíduos heterozigotos podem ser separados dos homozigotos, diferentemente de RAPD ou AFLP)



3. altamente polimórfico;
4. facilmente analisado pela técnica de PCR.

Estas vantagens foram consideradas neste estudo, onde se procurou identificar microsátélites específicos para algumas cultivares de soja e utilizá-los na identificação de linhagens oriundas de autofecundação, em dialelos obtidos para estudos de herança de resistência.

Ao estudar a herança de resistência ao vírus da necrose da haste da soja (VNHS), utilizando cruzamentos entre a cv. resistente (Pintado) e a cv. suscetível (CD 206), observou-se que a proporção entre plantas suscetíveis e resistentes sugeriam resistência determinada por um gene dominante. No entanto, avaliações posteriores mostraram que algumas plantas assintomáticas apresentaram sintomas de forte deformação foliar, fato que levantou dúvidas quanto à presença de plantas oriundas de autofecundações, na obtenção dos cruzamentos.

Este trabalho mostrou a importância dos microsátélites selecionados na identificação de plantas oriundas de autofecundação ou de cruzamentos bem sucedidos.

## Material e Métodos

**Cruzamentos.** Testes iniciais mostraram que a c.v. Pintado e a cv. CD 206 são resistentes e suscetíveis, respectivamente, ao vírus da necrose da haste (VNHS). Cruzamentos foram feitos entre essas duas cultivares e plantas da geração F<sub>2</sub> foram inoculadas mecânicamente com o VNHS.

**Extração de DNA.** Folhas de plantas de soja, suspeitas de ser originárias de autocruzamentos, foram maceradas em nitrogênio líquido. A extração de DNA será feita conforme descrição de Keim et al., (1988), a partir de tecido foliar liofilizado e moído...

**Microsátélites.** Neste estudo, foram utilizados primers de microsátélites de soja descritos por Cregan et al. (1999). Satt341, Satt222, Satt460, Satt316, Satt591, Satt519, Satt546, Satt274, Satt456, Satt380, Satt184, Satt276.

**PCR e Eletroforese.** As reações foram feitas conforme descrito por Akkaya et al. (1992), com algumas modificações. O volume final da reação de PCR, para cada amostra foi de 10 µl, contendo 1 µl tampão 10x, 0,3 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,52 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl de cada primer R e F, 0,2 µl Taq polimerase, 3 µl H<sub>2</sub>O miliq e 3 µl DNA (10 ng/ µl). A amplificação foi feita utilizando termociclador Eppendorf, com uma dissociação inicial a 94 °C por 7 min, seguindo-se 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e uma extensão de 72 °C por 7 min. As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) a 150V por 90 min. A coloração dos géis foi feita com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transiluminador com luz ultra-violeta.

## Resultados e Discussão

À semelhança de estudos anteriores conduzidos na Embrapa Soja, os primers de microsátélites utilizados permitiram verificar a presença de bandas específicas para cada um dos pais (Figura 1). Os microsátélites Satt 460, Satt 316 e Satt 456 permitiram separar a cv. suscetível CD 206 da cv. resistente Pintado.

Essa característica foi confirmada ao se comparar plantas oriundas dos cruzamentos entre a cv. Pintado e a cv. CD 206. Os resultados demonstram que todos os cruzamentos foram efetivos, todas as plantas são heterozigotas e todas contêm um alelo de cada progenitor (Figura. 2).

A próxima etapa será identificar marcadores associados ao gene de resistência ao vírus da necrose da haste da soja, úteis na seleção assistida. No futuro, o desenvolvimento de mapas genéticos mais saturados e o desenvolvimento de mais marcadores deverão contribuir com o programa de melhoramento da Embrapa Soja na obtenção de cultivares com uma constituição genética mais ampla para resistência a doenças.

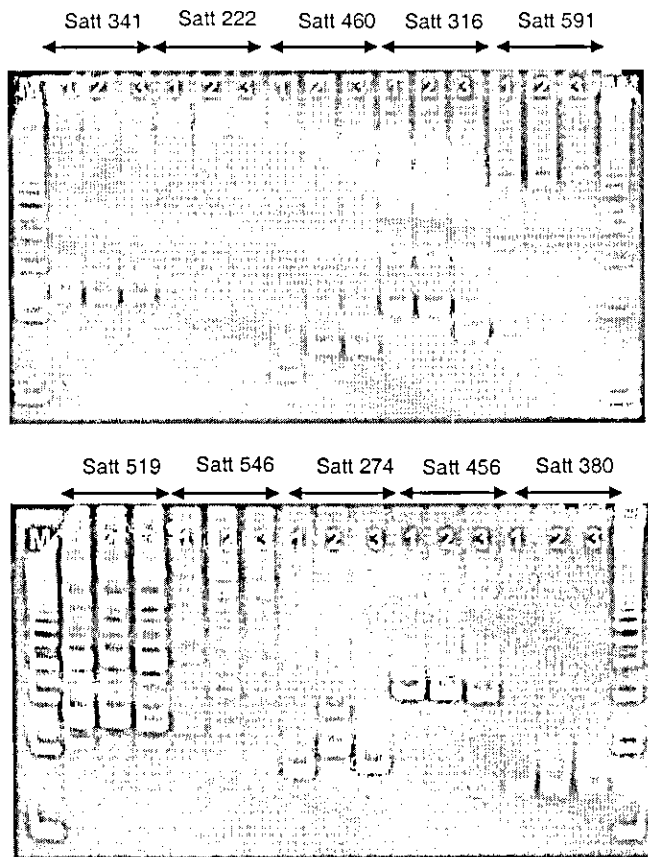


Figura 1. Perfis eletroforéticos de ampliações de DNA de cultivares de soja utilizando primers microsátélites. Identificação das amostras: M= marcador molecular 100 pb; 1= cv. CD 206; 2= cv. BRS 133; 3= cv. Pintado.



Figura 2. Perfis eletroforéticos de ampliações de DNA de plantas de soja oriundas do cruzamento da cv. Pintado e cv. CD 206. M= marcador molecular 100 pb; 1= cv. Pintado; 2= cv. CD 206.

## Considerações Finais

Microsatélites são regiões do genoma de animais e plantas que se caracterizam por possuir uma série de repetições de seqüências curtas de nucleotídeos (1 a 6 pb) que se repetem seguidamente na molécula de DNA ("tandem"). Essas regiões, não codantes, cuja sua origem e função, não estão bem claras. Os microsatélites apresentam, contudo, uma particularidade interessante. Entre dois indivíduos o número de vezes que aparece a seqüência básica é muito variável e pode diferir entre indivíduos. Portanto, ao se analisar essas regiões, é possível identificar diferenças entre eles. Essa característica dos microsatélites foi utilizada para diferenciar duas cultivares de soja que fizeram parte de um estudo de herança de resistência ao vírus da necrose da haste, uma doença que tem provocado significativas perdas em lavouras de soja. Do cruzamento

entre uma cultivar resistente (Pintado) com outra suscetível (CD 206), foi observada, na geração  $F_2$ , uma proporção de três plantas resistentes para uma planta suscetível, na maioria das linhagens derivadas de diferentes plantas  $F_1$ . Entretanto, algumas dessas linhagens não apresentavam esse padrão de segregação. Ao se procurar determinar a causa dessa variação, especulou-se se na geração  $F_2$  poderiam existir plantas oriundas de autofecundação. Microsatélites que apresentavam ampliações específicas para cada um dos pais foram identificados e utilizados, não se constatando a existência de plantas originárias de semente proveniente de autofecundação. A razão para a alteração observada continua sendo investigada. Este trabalho permitiu também identificar diferentes microsatélites, específicos para as duas cultivares citadas e que serão utilizados na obtenção de marcadores moleculares para detecção de gene de resistência ao VNHS.

## Referências

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREAGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.
- CREGAN, P., JARVIK, T., BUSH, A.L., SHOEMAKER, R.C., LARK, K.G., HHALER, A.L., VANTOI, T.T., LOHNES, D.G., CHUNG, J., SPECTH, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean. **Crop Science** v39, p. 1464-1490. 1999.
- KEIM, W., OLSON, P.T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, v.15, p.150-152, 1988.
- WEBER, J.L., AND P.E. MAY. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymera chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44:388-396.
- LITT, M., AND J. A. LUTY. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44:397-401.

TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl. Acids Res.**v 17 p.6463-6471.

JEFFREYS, A. J., V. Wilson, S.L. Thein. "Hypervariable minisatellite regions in human DNA," **Nature**, 314(6006):67-73, 1985.

## Seqüenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*

Daisy Rickli Binde<sup>1</sup>; Ligia Maria de Oliveira Chueire<sup>2</sup>; Ismael Hernandez Lucas<sup>3</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>4</sup>; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos<sup>4</sup>; Luiz de Paula Gonzaga<sup>4</sup>; Esperanza Martinez-Romero<sup>3</sup>; Fernando Gomes Barcellos<sup>5</sup>; Miriam Francisca da Silva<sup>6</sup>; José Eduardo Garcia<sup>7</sup>; Mariangela Hungria<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de Especialização da Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja; <sup>3</sup>Centro de Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México; <sup>4</sup>Laboratório Nacional de Computação Científica; <sup>5</sup>Bolsista de pós-doutorado do CNPq; <sup>6</sup>Bolsista de AT do CNPq; <sup>7</sup>UEL.

### Introdução

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) (FBN) é o processo de redução do  $N_2$  a amônia ( $NH_3$ ), catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esse complexo é encontrado somente em procariotos denominados fixadores de  $N_2$ , ou diazotróficos, incluindo bactérias e arqueobactérias. Nenhum organismo eucarioto, animal ou planta, é capaz de utilizar o  $N_2$  diretamente em seus processos biossintéticos, apesar da larga disponibilidade desse gás na atmosfera (cerca de 80%). A FBN constitui a principal via de incorporação do  $N_2$  à biosfera, perfazendo cerca de 65% do total, ou 96% da fixação por processos naturais e é considerada, após a fotossíntese, como o processo biológico mais importante, sendo fundamental para a vida na Terra (Hungria et al., 2005)

Hoje o Brasil é o segundo maior produtor de feijão do mundo (*Phaseolus vulgaris* L.), que é a fonte mais importante de proteína para a população. A cultura ocupou 4,8 milhões de hectares em 2001/2002, mas o país também apresenta uma das mais baixas produtividades mundiais, de apenas 834 kg/ha. O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N, pela simbiose com bactérias capazes de fixar o  $N_2$  de modo

eficaz, representa uma alternativa para aumentar o rendimento do feijoeiro nacional com baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos, pelo nitrato, e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa (Hungria et al., 2003).

*Rhizobium tropici* é uma bactéria Gram-negativa, com a habilidade de nodular leguminosas como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e a leucena (*Leucaena leucocephala*). Pode-se citar, dentre as principais características dessa espécie, a resistência a metais pesados, à acidez do solo e a temperaturas elevadas (Martinez-Romero et al., 1991). As características de adaptabilidade de *R. tropici* resultaram em que, para a cultura do feijoeiro, esta seja a única espécie de *Rhizobium* recomendada para o uso de inoculantes no Brasil (Hungria et al., 2003).

O genoma de *R. tropici* inclui vários plasmídeos e, em um deles, conhecido como plasmídeo simbiótico (pSym), estão todos os genes necessários à nodulação e FBN. Uma característica interessante do pSym é que seu "replicon" confere a capacidade de nodular e fixar N<sub>2</sub> a diferentes bactérias, que normalmente não possuem essa habilidade, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Ochrobactrum antropii*, *Brucella melitensis* e *Ensifer adherens*. Em um esforço para caracterizar geneticamente o pSym, o grupo de pesquisa de Cuernavaca tentou curar esse replicon. Contudo, só foram conseguidas deleções, sugerindo que o plasmídeo contém, além dos genes relacionados à nodulação e FBN, outros genes necessários para a sua viabilidade.

Este projeto propõe-se a realizar o seqüenciamento do pSym, da estirpe CFN 299 de *R. tropici*. Com isso, poderá ser possível: 1) Identificar novos genes envolvidos na interação planta-rizóbio; 2) Verificar se o pSym possui genes essenciais à sobrevivência da bactéria; 3) Verificar se o plasmídeo contém ilhas patogênicas ou simbióticas, bem como genes de metabolismo. Além disso, a análise dos genes do pSym permitirá entender os mecanismos que conduzem à grande adaptação de *R. tropici* em solos tropicais, ácidos e submetidos, com frequência, a temperaturas elevadas, definindo estratégias para a inoculação do feijoeiro que permitam a maximização do processo de FBN para esta cultura no Brasil.



## Objetivo

Realizar o seqüenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*, procurando genes relacionados à competitividade e eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio.

## Material e Métodos

### Construção de bibliotecas genômicas do pSym da estirpe CFN 299 de *R. tropici*

#### - Extração de DNA genômico

O DNA do pSym foi obtido no Centro de Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México e enviado para a Embrapa Soja. Até o presente momento, foram realizadas duas bibliotecas do pSym. O DNA foi extraído utilizando, para o rompimento da parede celular, degradação de proteínas, polissacarídeos, restos de parede e RNA, os reagentes SDS, proteinase-K, fenol, clorofórmio e RNase. Após a purificação, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

#### - Construção de bibliotecas

O preparo da biblioteca "shotgun" envolveu a purificação do DNA e a fragmentação deste DNA ao acaso, por meio mecânico (nebulização). O DNA misturado com glicerol 50% e NaOAc 3M foi nebulizado por 30 segundos a uma pressão de 2 Kgf/cm<sup>2</sup>, a fim de obter fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 2 kb. A fragmentação foi confirmada em gel de agarose 1%. Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Os fragmentos de 500 pb a 2 kb foram separados em gel de agarose "low melting", grau analítico. Após recuperação dos fragmentos a partir do gel de agarose, os mesmos foram colocados para se ligarem ao vetor pUC18, digerido com a enzima de restrição *Sma*I-BAP e defosforilados com a enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe DH10B, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio Luria-

Bertani contendo ampicilina (100 ug/ml, previamente esterilizada com filtro 0,2 µm), IPTG e X-gal e as bactérias foram crescidas durante a noite, a 37°C.

#### - Seqüenciamento

No processo de seqüenciamento, colônias brancas individuais (clones recombinantes) são inoculadas em placas de crescimento de cultura com 96 poços contendo meio "Terrific Grow" (12 g/L de bactotripton, 24 g/L de extrato de levedura e 4 mL/L de glicerol) e ampicilina (100 µL/mL). As bactérias são crescidas com agitação de 150 rpm, a 37°C, "overnight". As placas de crescimento de cultura são utilizadas para estoque em glicerol (80%), sendo então reinoculadas em blocos de crescimento, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Após o crescimento, são obtidos "pellets", por centrifugação a 4.000 rpm, por 8 minutos. O DNA é, então, extraído pelo método de rompimento alcalino. Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes são seletivamente precipitados com KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4°C, pH 4,7-4,9). O sobrenadante é filtrado por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) e o DNA, obtido através da filtragem, é purificado e resuspendido em água, verificando-se a concentração em gel de agarose a 1%.

O DNA precipitado é seqüenciado, utilizando-se o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR são realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso", para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação são analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

#### - Montagem do genoma

As leituras obtidas são submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC, com o programa SABIÁ, que integra vários programas de domínio público: "phred", "phrap", "Consed", "phrapview" e permite a identificação de ORFs ("open reading frames") como os programas "Glimmer", BLAST, KEGG, COG, INTERPRO e PSORT.

## Resultados

Duas bibliotecas já foram obtidas e validadas. Foi construída uma "homepage" para o projeto ([www.bnf.lncc.br](http://www.bnf.lncc.br)) e os resultados obtidos, até o presente momento, constam dos Quadros 1 e 2.

**Quadro 1.** Leituras do pSym de *R. tropici* CFN 299.

Número total de leituras	1.325
Número total de leituras sem vetores (<= 10% vector)	1.037
Número de leituras com 10-80% de bases de vetores	208
Número de leituras com mais de 80% de bases de vetores	80

**Quadro 2.** Bases obtidas do pSym de *R. tropici* CFN 299.

Número de bases depositadas (pb) (excluindo os vetores, incluindo bases de baixa qualidade)	1.220.032 (100%) (61% do genoma, estimado em 2 milhões de pb)
Número de bases com qualidade elevada >= 20 (pb)	718.579 (51,50%)
Número de bases com qualidade >=30 (pb)	585.373 (41,95%)
Número de bases com vetores (pb)	175.288 (12,56%)
Comprimento médio (pb)	920,78
Média de comprimento (qualidade >=20) (pb)	542,32
Cobertura do genoma sem considerar sobreposição	257.338 (12,9%)

## Considerações Finais

A estratégia de construção e validação das bibliotecas foi confirmada e deverá permitir o sequenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *R. tropici*.

## Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento parcial do Projeto (50.5499/2004-5, 50.5946/2004-1 e 301241/2004-0).

## Referências Bibliográficas

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.

## **Efeito da palha, da umidade e da esterilização do solo na produção de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

Daniele Cortezi<sup>1</sup>; T. Mituti<sup>1</sup>; Ivani O. Negrão Lopes<sup>2</sup>; Alexandre José Cattelan<sup>2</sup>; Paulo Roberto Galerani<sup>2</sup>; Eleno Torres<sup>2</sup>; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Estudante de Biologia da UNIFIL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

*Sclerotium rolfsii* infecta mais de 500 espécies vegetais (Aycock, 1966). Foi identificado, pela primeira vez, em 1926, infectando plantas de fumo, na África do Sul (Moore). Este fungo não produz esporos e perpetua-se através da produção de esclerócios, normalmente o inóculo primário encontrado em restos de plantas infectadas e também, no solo (Punja & Grogan, 1983). Segundo esses autores, a fase perfeita denominada *Athelia rolfsii*, tem sido obtida em laboratório, mas não foi identificada naturalmente na natureza.

Este patógeno é comum em regiões mais quentes e úmidas. Raramente ocorre em locais onde a temperatura de inverno cai abaixo de 0° C. O fungo ataca primeiramente hastes e ramos de plantas, mas pode infectar qualquer parte se as condições de ambiente forem favoráveis. A temperatura ideal para desenvolvimento micelial varia de 25 a 35° C. Esclerócios germinam bem quando a umidade do solo está entre 25-35%.

Considerando que não há cultivares de soja resistentes a esse patógeno, avaliou-se efeito de microrganismos antagônicos na sobrevivência de esclerócios, o efeito da palha e do teor de umidade do solo na germinação e produção de esclerócios. Este trabalho constituiu parte das observações realizadas nos experimentos de rotação-sucessão de culturas da Embrapa Soja.

## Material e Métodos

### 1. Isolamento e obtenção de esclerócios

Utilizou-se isolado de *S. rolfsii* obtido de soja (isolado 83) e multiplicado em meio de BDA. Os esclerócios formados na superfície do meio foram transferidos para frascos de vidro e mantidos a 10 °C até serem utilizados nos experimentos.

### 2. Coleta de amostras de solo e esterilização

Amostras de solo LATOSOLO ROXO foram retiradas à profundidade de 0-20 cm de profundidade, em diferentes campos, utilizando-se trado com 8 cm de diâmetro. As amostras foram peneiradas e secas à temperatura ambiente. Parte da amostra (200 g) foi utilizada para determinação da capacidade de campo. O restante foi dividido em partes iguais, sendo uma parte esterilizada a 120° C, em autoclave por 45 min e a outra, mantida sem esterilização.

### 3. Coleta de palha e esterilização

Palha de soja, milho e trigo, coletadas em campo, foram lavadas e secas. Posteriormente, foram acondicionadas em sacos de celofane e esterilizadas a 120 °C, em autoclave por 25 min.

### 4. Experimentos e delineamentos conduzidos

Efeito da esterilização do solo e da palha de cobertura na produção de esclerócios. Foram utilizadas duas amostras de solo (esterilizado e sem esterilizar) e três tipos de palha (soja, trigo e milho). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e nove repetições, por tratamento. Cada gerbox constituiu um tratamento. O solo esterilizado e sem esterilizar foi acondicionado em gerbox (3,2 cm x 11 cm x 11 cm), colocando-se cinco esclerócios sobre a superfície do solo e a seguir, cobriu-se com palha. O solo e a palha foram levemente umedecidos com 15 mL de água estéril. Cada gerbox foi pesado de modo a manter a umidade. Pesagens foram feitas diariamente, por cerca de 3 semanas quando a palha foi retirada e o esclerócios coletados da palha e da superfície do solo. A seguir os esclerócios de cada gerbox foram contados.

- Efeito da umidade do solo na produção de esclerócios. Utilizou-se parte do solo coletado para o experimento 1. O solo foi esterilizado a 120 °C, em autoclave por 45 min . A seguir determinou-se a capacidade de campo. Após distribuído em gerboxes, metade das amostras foi mantida na capacidade de campo e a outra metade, com 75% desse valor. Cinco esclerócios foram colocados na superfície do solo de cada gerbox e cobertos com palha de soja. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e cinco repetições por tratamento. Cada gerbox constituiu uma repetição.

Os tratamentos constam das Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados na avaliação do efeito da esterilização do solo e da palha de cobertura na produção de esclerócios.

Tratamento	Solo	Palha
1	Esterilizado	Milho
2	Esterilizado	Soja
3	Esterilizado	Trigo
4	Não esterilizado	Milho
5	Não esterilizado	Soja
6	Não esterilizado	Trigo

**Tabela 2.** Tratamentos utilizados na avaliação do efeito da umidade do solo na produção de esclerócios.

Solo	Palha	Umidade
Esterilizado	Soja	Capacidade de campo
Esterilizado	Soja	75% da capacidade de campo

## Resultados

A Tabela 3 mostra o número médio de esclerócios produzidos nas diferentes palhas utilizadas, sobre solo com e sem esterilização. Os resultados demonstram que, em solo estéril, a palha de trigo favoreceu mais a

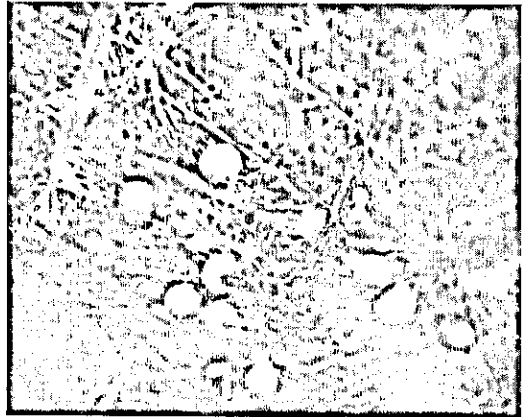
**Tabela 3.** Número de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* formados em solo esterilizado e não esterilizado, com cobertura de palha de trigo, soja e milho.

Solo	Palha		
	Trigo	Soja	Milho
Estéril	193,8 aA*	55,5 aA	100,8 aA
Não estéril	4,6 aB	11,4 aB	16,9 aB
C.V. 17,14%			

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

produção dessas estruturas do que o milho e a soja (Fig.1). Também se constatou que a esterilização do solo contribuiu para o desenvolvimento de esclerócios, mostrando a ação benéfica de outros microrganismos na competição saprofítica por restos de cultura e parasitismo dos esclerócios, especialmente por *Trichoderma* sp. (Fig. 2). A esterilização do solo eliminou os microrganismos antagônicos.

*Sclerotium rolfsii* não apresentou maior desenvolvimento e produção de esclerócios quando a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo, em comparação com o solo levemente mais seco, o qual foi mais favorável ao desenvolvimento do patógeno (Tabela 4).



**Figura 1.** Desenvolvimento de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* em palha de trigo.





Figura 2. Parasitismo observado em esclerócios por *Trichoderma* sp.

Tabela 4. Efeito da umidade do solo (capacidade de campo e 75% desse valor), na formação de esclerócios de *Sclerotium rolfsii*.

Umidade do solo	Média
Capacidade de campo	22,4 b
75% do valor da capacidade de campo	65,8 a
C.V.%	18,1

\* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Análise efetuada com dados transformados em  $\sqrt{x}$ .

## Referências Bibliográficas

- AYCOCK, R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. **North Carolina State University**, 1966. 202p. (Technical bulletin, 174)
- MOORE, E.S. Diseases of Virginia tobacco in South Africa. **Union South Africa Journal Dep. Agric.** v.12: 428-455. 1926.
- PUNJA, Z.K.; GROGAN, R.G. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. **Phytopathology**. v.73: 1279-1284, 1983.

## **Desenvolvimento tecnológicos do “requeijão” cremoso de soja**

---

Elielma C.X. Colla<sup>1</sup>; Solange A.O. Neves<sup>2</sup>; Vera de Toledo Benassi<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Acadêmica da UniFil e bolsista Embrapa Soja; <sup>2</sup>Docente UniFil; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

### **Resumo**

Nos últimos anos a ciência da nutrição tem aberto novas fronteiras ligando tecnologia de alimentos e medicina com o surgimento do conceito de alimentos funcionais, porém a descoberta de novos produtos alimentícios contendo componentes ativos capazes de reduzir o risco de doenças, adaptados ao consumo da população pode facilitar novos hábitos alimentares, saudáveis, quebrando obstáculos e preconceitos relacionados a alguns alimentos, entre eles o soja.

O estado nutricional de populações vivendo em países industrialmente desenvolvidos pode claramente ser mostrado pelas tendências desfavoráveis como o excessivo consumo de gorduras, principalmente saturadas, açúcar e sal e, ainda, diminuição considerável do consumo de amido e fibras dietéticas (STAMLER, J.,1993). Estudos epidemiológicos têm confirmado essa tendência que indica déficit do consumo de ácidos graxos poliinsaturados, proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais, assim como em países subdesenvolvido. Este estado nutricional carente tem originado elevadas incidências de doenças crônico degenerativas, dentre elas doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, diabetes, obesidade, entre outras. A situação é tão grave que dados da OMS mostram que essas doenças são responsáveis por 70-80% da mortalidade nos países desenvolvidos e cerca de 40% naqueles em desenvolvimento.

Estima-se que 1/3 dos casos de câncer estão relacionados à dieta. Além da relação com as doenças crônicas, há fortes evidências do papel da dieta em melhorar a performance mental e física, retardar o processo de

envelhecimento, auxiliar na perda de peso, na resistência às doenças, entre outros (DE ANGELIS, 2001).

Hoje, para a maioria dos pesquisadores a única saída para alterar esses dados preocupantes é o aumento do consumo de grãos, frutas e vegetais, fazendo com que a população mude seus hábitos alimentares e siga o que Hipócrates pregava, “Faça do alimento o seu medicamento”.

No Brasil, a soja é o alimento que mais oferece possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais, já que o país é o segundo maior produtor mundial (LAURIL, C., 2004). E mesmo com dados tão importantes, a população ocidental ainda não está adaptada ao consumo destas leguminosa.

A soja e seus derivados tem recebido considerável atenção dos pesquisadores ao longo dos anos, principalmente devido a qualidade e quantidade de sua proteína, sendo considerada dentre os vegetais, um excelente substituto dos alimentos de origem animal. Além disso, dados epidemiológicos já mostravam que o seu elevado consumo por populações orientais (principalmente China e Japão), poderia ser o fator determinante na baixa incidência de doenças como certos tipos de câncer (mama, próstata e cólon), doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da menopausa quando consumida periodicamente (WEI H., et all, 1995).

Este “grão de ouro” ainda não é um produto de fácil acesso nos mercados brasileiros. Não pela quantidade, preço ou produção, mas sim pelo sabor, que é considerado rançoso ou pelo chamado *beany- flavor* (um gosto forte de mato). O *beany- flavor* está diretamente ligado á presença de aldeídos e hidrocarbonetos, que são formados durante o processamento inadequado dos grãos. Muitos pesquisadores estão desenvolvendo variedades sem as enzimas lipoxigenases responsáveis pela formação deste sabor desagradável, além de aumentar o teor de proteína e isoflavonas do grão (MOREIRA, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo formular um “requeijão” de soja cremoso com finalidade em ser mais uma nova alternativa de se consumir um produto com propriedades funcionais e sensoriais agradáveis ao

paladar. Para desenvolver esse produto partiu-se de duas formulações. A primeira em que se utilizou extrato hidrossolúvel de soja acrescentado de vários hidrocolóides individualmente. Os hidrocolóides que propiciaram a melhor consistência cremosa foram o amido de mandioca (5%) e a carboximetilcelulose (20%) quando comparados com amido de milho, farinha de arroz, fécula de batata, araruta e farinha de aveia em todas concentrações testadas 5%, 10% e 20%. Devido à solubilidade ou dispersão em meio aquoso à temperatura ambiente a carboximetilcelulose apresentou melhor aspecto para o processamento técnico adotado. A segunda formulação partiu-se da proteína coagulada de soja, utilizando extrato hidrossolúvel de soja por processamento caseiro, aquecido a 65°C e coagulado com sulfato de magnésio. Em seguida foi acrescentado 20% de óleo vegetal e 5% de água, posteriormente foi liquidificada e obtida uma pasta homogênea de cor característica ao extrato hidrossolúvel de soja. Essa segunda formulação foi a que mais se aproximou do requeijão cremoso de leite de vaca em termos de consistência e cremosidade. Para as duas formulações foi possível acrescentar aromatizantes em diversos sabores de queijo ou ervas finas com o objetivo de mascarar o possível sabor residual. A determinação da vida de prateleira e a análise sensorial serão realizadas na próxima etapa.

Como parâmetro para avaliar a estabilidade do produto, serão determinados pH e acidez total, seguindo a metodologia do Instituto Adolf Lutz, e contagem total de microrganismos (bactérias e fungos) de acordo com a metodologia exposta no Manual Merck, assim como, a composição centesimal onde umidade, cinza, lipídios totais, proteínas totais, serão determinadas conforme bibliografia referenciada. Para verificar a aceitação e/ou preferência do “requeijão” cremoso de soja, será utilizada a escala hedônica de nove pontos. O modelo estatístico a ser utilizado será análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias serão comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Apesar de diversos estudos estarem demonstrando os grandes benefícios para a saúde humana, esta rica oleoginosa e muitos de seus derivados ainda não fazem parte da dieta dos brasileiros, que se dizem não habituados ao seu sabor. A divulgação do elevado valor nutricional da soja, assim

como sugestões de preparações diferenciadas, ou a utilização de condimentos que reduzam ou mascarem o sabor que desagrada muitos consumidores deve ser mencionado, trabalhado e estudado por profissionais da área.

## Referências

DE ANGELIS, R.C.; Prevenção Nutricional a partir de qual idade? Cap. 27 Fome oculta. Atheneu,2001.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas analíticas de Instituto Adolf lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos V.1, 3º ed., São Paulo, 1981.

LAURIL C.; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, disponível on-line: [www.ibge.gov.com.br](http://www.ibge.gov.com.br), em 27/09/2004.

MANUAL MERCK. Análise microbiológica de alimentos. 3ed. São Paulo. 1982.

MOREIRA, M.A.; Revista Minas Faz ciência nº12- FAPEMIG; Disponível on-line: [www.revista.fapemig.br](http://www.revista.fapemig.br), em 20/09/2004.

PARK, Y.K; Aguiar, C.L, Alencar, S.M.; Mascarenhas, H.A Scampini, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira, Revista de ciência e tecnologia de Alimentos; vol 3, nº3, p156-160;2001.

STAMBLER, J. Epidemiologia da obesidade nos Estados Unidos, Arch. Intern. Med. 153:1040-4, 1993.

SANTOS, O., A cultura da soja- RS/SC/PR 2º edição. Editora Globo, São Paulo, 1995.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q.; Antioxidant and antipromitonal effects of the soybean isoflavoe genistein. Proceedings of the society for experimental biology and Medicine, New York, V.208, N.1, p. 124-130,1995.

# Efeito antagonista de células e exsudatos de *Chromobacterium violaceum* contra fungos patogênicos de sementes de soja e contra a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera:Noctuidae)

---

Eriana Serpa Barreto<sup>1</sup>; Rodrigo Masel Capeletti Cioato<sup>2</sup>; Marliton Rocha Barreto<sup>3</sup>; Mariangela Hungria<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de DTI do CNPq; <sup>2</sup>Bolsista de ITI do CNPq; <sup>3</sup>Doutorando na Embrapa Soja; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria saprófita, Gram-negativa e aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. No Brasil, ocorre com abundância na água e nos bancos de areia do Rio Negro, na Região Amazônica. A cor do pigmento produzido por *C. violaceum*, a violaceína, representa uma de suas características mais atrativas. A violaceína apresenta atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. e, também, atividade antifúngica, antiviral e antitumoral (Durán et al., 2001). Essas características levaram à escolha da estirpe-tipo ATCC 12472, isolada de águas fluviais frescas em Mentekab, Malásia, como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente seqüenciado por um consórcio de laboratórios de âmbito nacional (Projeto Genoma Brasileiro MCT/CNPq). O seqüenciamento revelou um cromossomo circular com 4.751.080 pares de bases e 4.429 "open reading frames" (ORFs), tendo sido identificadas 2.715 proteínas conhecidas, 958 hipotéticas conservadas e 756 proteínas hipotéticas (Vasconcelos et al., 2003).

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande importância econômica para o Brasil, mas pode ser limitada por diversos patógenos de sementes que, inclusive, praticamente inviabilizam a semeadura sem

o uso de defensivos agrícolas em diversos locais do país (Araújo, 1995). Em relação aos fungos patogênicos, as estimativas atuais são de que, desde a safra 2001/2002, o tratamento de sementes de soja com fungicidas vem sendo utilizado em mais de 93% da área semeada no Brasil (Henning, 2004). Já em relação a insetos, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera:Noctuidae), é uma das principais pragas desfolhadoras de plantas de soja, sendo alvo da maior parte das aplicações de inseticidas na cultura (Secchi, 2002).

## Objetivos

Verificar a atividade biocida das células e dos exsudatos da estirpe padrão e de dois isolados de *Chromobacterium violaceum* da Amazônia contra fungos patogênicos de sementes de soja e contra a lagarta-da-soja.

## Material e Métodos

A atividade biocida da estirpe padrão e de dois isolados selecionados, 07 e 27, bem como de seus respectivos exsudatos foi testada contra sete fungos patogênicos de sementes de soja (*Aspergillus* sp., *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Corynespora* sp. e *Botryodiplodia* sp.). Esses fungos estão relacionados a doenças importantes na cultura da soja, como a queima-da-haste (*Phomopsis* sp.), a antracnose (*Colletotrichum* sp.) e a síndrome da morte súbita (*Fusarium* sp.). Duas metodologias foram utilizadas para avaliação da atividade antifúngica, segundo Araújo (1995), com modificações. Na primeira, os fungos foram inoculados, por meio de discos com micélio, em quatro pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio BDA (200g de batata, 12g de glicose em 1.000mL de água destilada, 1,5% de ágar), 24h antes da inoculação das bactérias e do exsudato filtrado. As bactérias foram cultivadas em meio CV contendo 0,6% de cloreto de sódio, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 0,25% de glicose dissolvidos em água destilada, durante 24h, a uma temperatura de 28 a

30°C, com agitação de 100 rpm. A seguir, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato pH 6,5 e ressuspensas no mesmo tampão, até atingir a concentração de 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. Para o tratamento com os exsudatos, as bactérias foram cultivadas nas mesmas condições já citadas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, procedendo-se à filtração do sobrenadante em filtro do tipo Millipore (0,2 µm). No orifício central da placa foram colocados 80 µL de cada cultura de célula, ou do respectivo sobrenadante filtrado. Os ensaios foram conduzidos com três repetições e as placas incubadas à temperatura de 28°C durante sete dias. Após esse período, foram avaliados os halos de inibição da bactéria e do exsudato em relação aos fungos. Na segunda metodologia, a bactéria foi inoculada em um círculo externo e os discos contendo os micélios foram colocados na parte central da placa de Petri. No caso de ausência de atividade biocida, os fungos continuam a crescer, mesmo na presença da bactéria, ou do exsudato.

A habilidade inseticida da estirpe padrão, dos isolados 07 e 27, e de seus respectivos exsudatos também foi testada contra a lagarta-da-soja. As bactérias foram cultivadas em meio CV. Os tratamentos utilizados continham culturas com 24h, 48h e 72h de crescimento, conforme sugerido em Martin et al. (2004), em diluições de 10<sup>9</sup>-10<sup>12</sup> células mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato pH 6,5, e os respectivos exsudatos foram esterilizados por filtração em membrana com 0,45 µm de poro. Os controles foram feitos com água destilada e meio de cultura CV.

As lagartas foram alimentadas com dieta artificial de Hoffmann-Campo et al. (1985). O experimento foi realizado segundo Barreto et al. (1999). No bioensaio foram testadas 20 larvas de 2<sup>ª</sup> ínstar da lagarta da soja para cada tratamento. Cada pedaço de dieta (2 cm x 0,8 cm x 0,5 cm) foi embebido nas suspensões contendo as bactérias e nos respectivos exsudatos e foi oferecido às larvas, as quais foram mantidas em copos plásticos de 50 mL com tampa, a uma temperatura e umidade relativa aproximadas de 25°C e 50%, respectivamente. A cada 24 ou 48h foi acrescentada nova dieta e o tempo de exposição às bactérias e aos exsudatos foi de 24h para todos os tratamentos. A mortalidade foi acompanhada diariamente, durante todo o período larval.



## Resultados

Os ensaios iniciais mostraram atividade antagonista promissora, principalmente contra os fungos *C. kikuchi*, *Colletotrichum* sp. e *Corynespora* sp. A atividade biocida foi confirmada utilizando a segunda metodologia, com o fungo crescendo na parte central da placa. Essa segunda metodologia também se mostrou mais eficaz na avaliação da atividade antifúngica. É interessante observar que o potencial antifúngico dos dois isolados da Amazônia foi superior ao da estirpe padrão, e que os tratamentos com as culturas de células foram mais eficientes quando comparados aos tratamentos com os exsudatos. Shirata et al. (2000) demonstraram uma atividade inibitória da violaceína produzida por *Janthinobacterium lividum*, que foi particularmente forte contra *Colletotrichum dematium* e *Rosellinia necatrix*, os quais causam antracnose e o apodrecimento branco das raízes de amoreira, respectivamente. Esse resultado ratifica a existência de atividade fungicida da violaceína, também produzida pelas células de *C. violaceum*.

Não foi verificada atividade inseticida de *C. violaceum* contra a lagarta da soja em nenhum dos tratamentos. Também não foi verificado qualquer tipo de inibição no desenvolvimento da lagarta. As bactérias púrpuras tais como *C. violaceum* não são, frequentemente, isoladas de insetos e, também, não são consideradas seus patógenos, mas foi verificado, por Martin et al. (2004), que a estirpe PRAA4-1 de *Chromobacterium* sp., isolada em Maryland, nos Estados Unidos, é tóxica às larvas do besouro da batata do Colorado (Coleoptera: Chrysomelidae), o que demonstra a capacidade inseticida desse tipo de bactéria e reforça a necessidade de busca de novos métodos para sua utilização no controle biológico de pragas agrícolas.

## Considerações Finais

Houve indicação de atividade biocida em *Chromobacterium violaceum* contra fungos fitopatógenos de sementes de soja, mas não foi observada atividade inseticida contra a lagarta da soja.

## Agradecimentos

Financiado parcialmente pelo CNPq (680.220/00-5). Os autores agradecem a Fábio F. Araújo, à Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos (LNCC) pelo apoio na condução do projeto e a Daniel Sosa-Gómez pela utilização do Laboratório de Patologia de Insetos (Embrapa Soja). As estirpes da Amazônia foram isoladas pelo grupo do Prof. Spartaco Astolfi-Filho (Universidade Federal do Amazonas). As lagartas foram fornecidas pelo Laboratório de Criação Massal de *Anticarsia gemmatalis* (Embrapa Soja).

## Referências

- ARAÚJO, F.F. Efeito de *Bacillus* spp. e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine max* [L] Merrill) por *Bradyrhizobium* spp. 111f. Dissertação de mestrado – Departamento de Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 1995.
- BARRETO, M.R.; LOGUERCIO, L.L.; VALICENTE, F.H.; PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, São Paulo, v.28, n.4, p.675-685, 1999.
- DURÁN, N.; RETTORI, D.; MENCK, C.F.M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n.20, p.38-43, 2001. (Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>.).
- HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51p. (Embrapa Soja. Documentos, 235).
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1985. 23p (Embrapa Soja. Documentos, 10).
- MARTIN, P.A.W.; BLACKBURN, M.; SHROPSHIRE, A.D.S. Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, Maryland, v. 97, n.3, p.774-780, 2004.
- SECCHI, V.A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma

revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.3, p. 49-54, 2002.

SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. **Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing**, 1999. Disponível em: [http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/34-2/shirata/34-2\(8-2\).htm](http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/34-2/shirata/34-2(8-2).htm). Acesso em 01 dez. 2004.

VASCONCELOS, A.T.R.; ALMEIDA, D.F.; HUNGRIA, M.. 106 other authors. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.100, p.11660-11665, 2003.

## Panorama genômico de *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81 (Semia 4080)

---

Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1</sup>; Lígia Maria de Oliveira Chueire<sup>2</sup>; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos<sup>3</sup>; Marisa Fabiana Nicolas<sup>3</sup>; Luiz Gonzaga<sup>3</sup>; Emilene André<sup>4</sup>; Mariangela Hungria<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de Doutorado UEL/Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja; <sup>3</sup>Laboratório Nacional de Computação Científica; <sup>4</sup>Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

### Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A cultura do feijoeiro ocupou, nas três safras anuais conduzidas em 2004, cerca de 4.000.000 ha, com uma produção de mais de 3.000.000 toneladas, mas com rendimento médio nacional bastante baixo, de apenas 826 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2004). O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa. A eficiência do processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN) com a cultura do feijoeiro, porém, tem sido considerada baixa, por problemas relacionados à nodulação, dificuldade de introdução de melhores estirpes e baixa tolerância a estresses ambientais, como temperaturas elevadas e deficiência hídrica.

Contudo, a seleção, por nosso grupo de pesquisa, de estirpes mais eficientes e competitivas, dentro da variabilidade natural da população do solo, conseguiu identificar a estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *R. tropici*. A obtenção de rendimentos elevados de até 4.000 kg ha<sup>-1</sup>, obtidos com a inoculação da estirpe PRF 81 conduziram à sua recomendação para o uso em inoculantes comerciais desde 1998 (Hungria et al., 2000, 2003).

Como o Brasil é, atualmente, o país que mais utiliza a tecnologia de inoculação (Hungria et al., 2003), torna-se importante desenvolver estudos de genômica com estirpes brasileiras, particularmente com o microssimbionte do feijoeiro, cultura que necessita um impulso tecnológico para incrementar os rendimentos a um baixo custo.

Por meio de uma estratégia denominada determinação do panorama genômico, baseada no seqüenciamento parcial, de cerca de 10% a 15% do genoma (Viprey et al., 2000), da estirpe PRF 81 de *R. tropici* é possível identificar, por homologia com os demais genomas, genes relacionados com o processo de FBN, bem como com a capacidade saprofítica. Pela análise desses genes é possível, ainda, identificar diferenças na estrutura do genoma dessa estirpe eficiente e competitiva e que permitam delinear novas estratégias que contribuam para minimizar as limitações à FBN, freqüentemente relatadas na simbiose com a cultura do feijoeiro.

## Objetivo

Obter o panorama genômico, com a cobertura de 10 a 15% do genoma da estirpe de *Rhizobium tropici* PRF 81 (= SEMIA 4080), utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijão.

## Material e Métodos

### - Extração do DNA genômico

A partir dos "pellets" obtidos de células da estirpe PRF 81 de *R. tropici*, após o crescimento em meio de cultura LB (Sambrook et al., 1989), centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C, o DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método descrito por Sambrook et al. (1989). Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes foram seletivamente precipitados com o reagente CTAB ("*hexadecyltrimethylammonium bromide*") e o DNA de alto peso molecular

foi recuperado do sobrenadante por precipitação com etanol. Este DNA de alto peso molecular e de boa qualidade foi utilizado para a construção das bibliotecas de "shotgun".

#### - Construção de bibliotecas "shotgun"

Após a purificação do DNA genômico, a fragmentação do DNA foi realizada ao acaso, por meio mecânico (nebulização). Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli* e/ou a DNA polimerase T7-fago. Fragmentos com tamanho entre 1,5-4,0 kb foram separados em gel de agarose "low melting". Após a recuperação destes fragmentos a partir do gel de agarose, os mesmos foram colocados para se ligarem ao vetor pUC18, digerido com a enzima de restrição *Sma*I. e desfosforilados com a enzima T4 DNA ligase. Após a ligação o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe DH10B, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 mg. mL<sup>-1</sup>) e crescidas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes produzidos foram, então, transferidos para placas do tipo ELISA de 96 poços, contendo meio líquido "Terrific Broth" suplementado com ampicilina (100 mg. mL<sup>-1</sup>) e glicerol a 8% e armazenados a -70°C.

#### - Seqüenciamento dos clones

As colônias individuais das bibliotecas obtidas foram inoculadas em meio "Terrific Grow" acrescido de ampicilina (100 mg. mL<sup>-1</sup>) e foram crescidas com agitação de 300 rpm, por 16 horas, a 37°C. O DNA foi extraído pelo método usual de rompimento alcalino (Sambrook et al., 1989), com uma modificação no final do procedimento, que é o da passagem do sobrenadante por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) antes da precipitação do DNA. O DNA purificado foi ressuspenso em água e verificado em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA foi precipitado, procedendo-se ao seqüenciamento utilizando o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso" (Invitrogen), para se conseguir a

amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes. As seqüências obtidas foram enviadas para a "homepage" "<http://www.nbf.lncc.br>" e submetidas a um programa de alinhamento de seqüências e construção de possíveis "contigs" (Phred, Phrap e Consed), e as seqüências "consensus" resultantes desses alinhamentos foram posteriormente analisadas para verificar alinhamentos significativos (BLAST nucleotide-nucleotide) com seqüências de DNA de outras bactérias depositadas em banco de dados disponível no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## Resultados e Discussão

Foram feitas oito bibliotecas e foram realizadas 4.789 leituras, 94% delas com ótima qualidade, possuindo menos de 10% de vetores, confirmando a validade das bibliotecas. Ao todo, já foram lidas 52 placas, provenientes de oito bibliotecas, que resultaram em 5.074.975 pares de bases (pb), 2.221.754 pb das quais com qualidade igual ou superior a 20 (Quadro 1). Estimando-se o genoma em 7.000.000 de pb, essas bases de boa qualidade seriam suficientes para cobrir cerca de 32% do genoma. Contudo, pela natureza da biblioteca "shotgun", em que vários fragmentos correspondem a seqüências idênticas, a cobertura obtida, até o presente momento, é de 13,69% (Quadro 2).

**Quadro 1.** Total de bases obtidas no seqüenciamento do genoma da estirpe PRF 81 de *R. tropici*

Número de bases depositadas (pb) (excluindo vetores, incluindo bases de baixa qualidade)	5.074.975 (100%)
Número de bases com qualidade $\geq 20$ (pb)	2.221.754 (42.22%)
Número de bases com qualidade $\geq 30$ (pb)	1.795.154 (34.12%)
Número de vetores (pb)	186.815 (3.55%)
Comprimento médio (bp)	1059,71
Comprimento médio (qualidade $\geq 20$ ) (pb)	463,93

<b>Quadro 2.</b> Parâmetros no seqüenciamento da estirpe PRF 81 de <i>R. tropici</i>	
Parâmetro	Situação em 05/2005
Número de “singlets” isolados de phrap	2.053 (42,87% do no. total de leituras)
Número de “phraps” não vetores isolados nos “singlets”	1.175 (57,23% dos “singlets”)
Número de “singletons” isolados	1.239
Número de “contigs” phrap	868
Tamanho médio dos “contigs”	1104,27
Número médio de leituras em um “contig”	2,34
Número total de “contigs”	2.043
Cobertura por “contigs” phrap (pb)	890.686
Cobertura por “singletons” (pb)	67.822
Qualidade media das bases nos “contigs” phrap	22,30
Cobertura do genoma (estimado em 7.000.000 pb), considerando-se a soma dos “contigs” (pb)	958.508
Cobertura do genoma	13,69%

Os genes putativos estão sendo identificados com o uso de ferramentas da bioinformática, de predição de genes. Pelo uso do BLASTX, já foi possível identificar mais de 1.500 genes putativos, podendo-se citar, como exemplo, aqueles que codificam a proteína SMb20348, de *S. meliloti*, adesinas, proteína blr4512 de *B. japonicum*, mII2848 e mlr8056 de *M. loti*, Y4ql de *Rhizobium* sp. NGR234, NifA, NodA, NodQ, NodU, NodS, proteína regulatória P-II, proteína “heat shock” ClpX, entre outros.

### Considerações Finais

O panorama genômico foi uma estratégia excelente para a cobertura parcial do genoma da estirpe de *Rhizobium tropici* PRF 81 (=SEMIA 4080), utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro.



## Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento parcial do Projeto (50.5499/2004-5, 50.5946/2004-1 e 301241/2004-0).

## Referências

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Análise conjuntural de 2002**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 fev. 2004.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39, p.88-93, 2003.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W.K.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v.1, p.1-17, 2000.

## Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos dos cerrados

---

Fabio Plotegher<sup>1</sup>; Iêda Carvalho Mendes<sup>2</sup>; Mariangela Hungria<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de IC do CNPq; <sup>2</sup>Embrapa Cerrados; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

O feijão é a base da alimentação de cerca de 300 milhões de pessoas, especialmente na América Latina e no sul e leste da África, sendo considerado, por alguns nutricionistas, um alimento perfeito, pois é fonte de proteínas, fibras e carboidratos complexos. Estima-se que, para mais de 100 milhões de consumidores pobres, cuja dieta é baseada em amido, essa leguminosa representa a única fonte protéica. O Brasil é, hoje, o segundo maior produtor mundial de *Phaseolus* e o primeiro produtor e consumidor de feijão, contudo, os rendimentos médios obtidos são bastante baixos, de apenas 826 kg/ha (CONAB, 2004). O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa. Para o estabelecimento de uma simbiose efetiva é necessário, porém, um maior conhecimento da diversidade dos rizóbios nativos capazes de nodular a leguminosa. Em estudos anteriores, foi constatada diversidade genética elevada de rizóbios nos Cerrados (Mostasso et al., 2002) e, dentro dessa diversidade, foi possível selecionar estirpes mais eficientes e competitivas (Hungria et al., 2003). Contudo, estudos mais abrangentes precisam ser conduzidos para um conhecimento mais preciso da diversidade de rizóbios nos Cerrados.

## Objetivos

Caracterizar geneticamente rizóbios microssimbiontes de feijoeiro em áreas nativas dos Cerrados

## Material e Métodos

Foram coletados nódulos de diversos locais nos Cerrados, nunca cultivados anteriormente. O DNA das bactérias foi extraído a partir de culturas puras de rizóbios em meio YMA, segundo procedimento otimizado (Kaschuk, 2003). O DNA foi amplificado pela técnica de PCR com o "primer" BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) e os seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 6 horas. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,00005%), observado em transluminador UV e fotografado. Essa técnica verificou a variabilidade genética em nível de estirpes. O polimorfismo foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

O DNA também foi amplificado com "primers" que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA: Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCGTGGCGGC-3') e Y3 (3'-CTGACCCCAACTTCAGCATTGTTCCAT-5'). Os produtos dessas ampliações foram submetidas à metodologia de RFLP-PCR (Laguerre et al., 1994), com as seguintes enzimas de restrição: *HaeIII*; *MspI* e *RsaI*. Os fragmentos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 3% e corridos em sistema de eletroforese a 120 V durante 4 horas. O polimorfismo também foi analisado usando o programa Bionumerics.

## Resultados e Discussão

O nível de diversidade genética encontrado na análise de BOX A1R-PCR foi muito elevado, pois praticamente cada estirpe apresentou um perfil único (Fig. 1). Essa análise indica variabilidade entre estirpes, contudo, o grande número de perfis obtidos representa um forte indicativo de diversidade genética elevada, provavelmente com várias espécies novas, ainda não descritas.

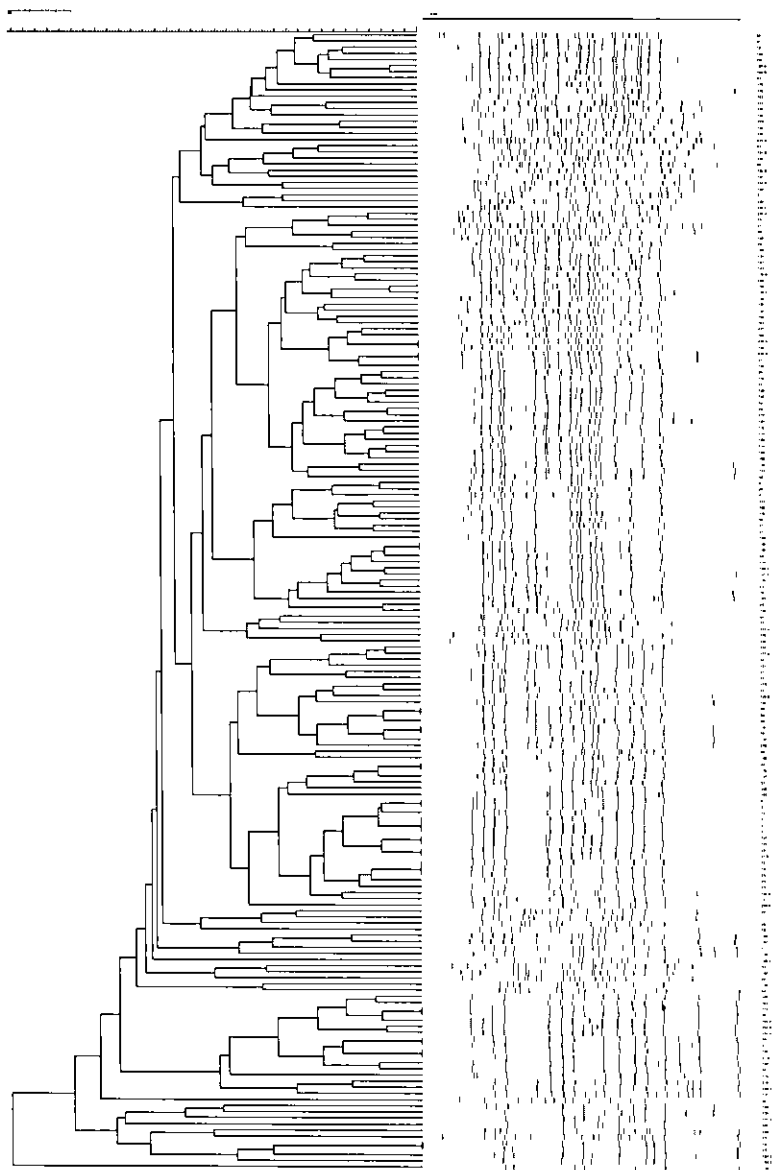
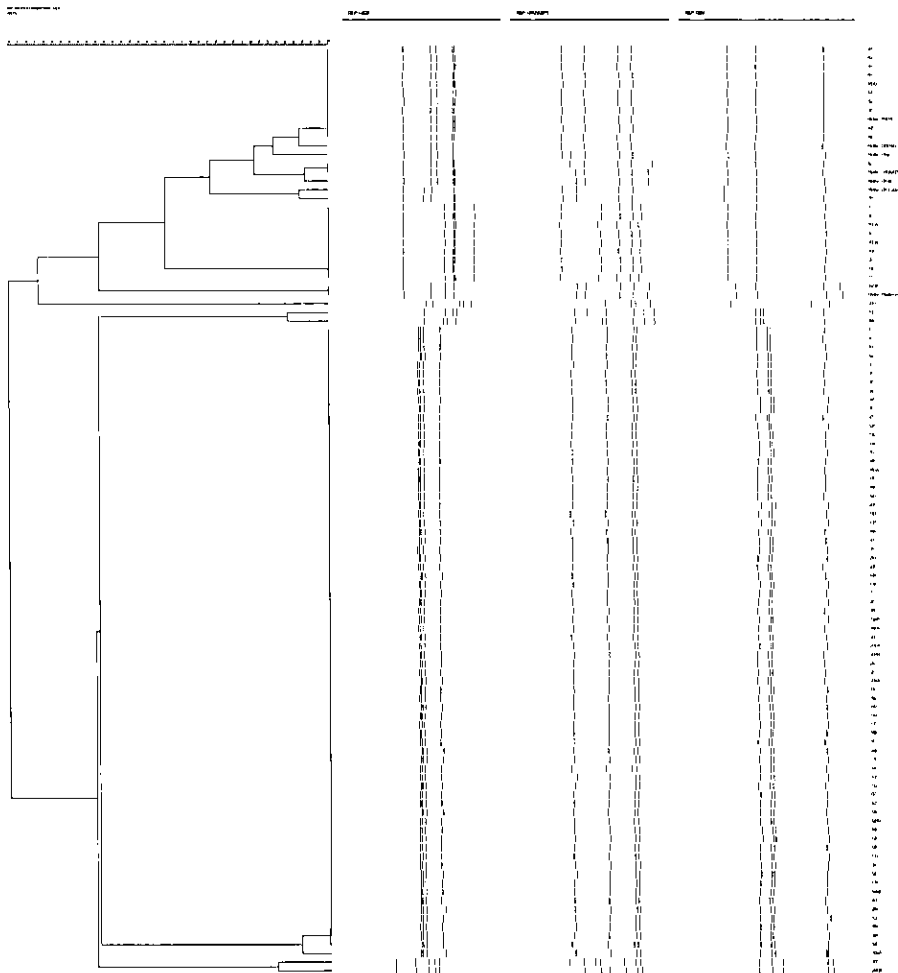


Figura 1. Análise de agrupamento dos produtos de DNA obtidos por BOX A1R-PCR de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de solos de Cerrados.

Na análise por RFLP-PCR da região do gene ribossomal 16S, houve indicação de predomínio de uma espécie (Fig. 2). Contudo, outras espécies foram observadas, diversas delas bastante distintas das estirpes-tipo usadas como referência, representando outro indicativo de novas espécies de rizóbios nos Cerrados.



**Figura 2.** Análise de agrupamento dos produtos de DNA obtidos por RFLP-PCR de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de solos de Cerrados

## Considerações Finais

A diversidade genética elevada observada em rizóbios microssimbiontes do feijoeiro é um forte indicativo de que muitas espécies de rizóbios dos solos tropicais ainda não foram descritas e que o patrimônio genético dos microrganismos em solos brasileiros precisa ser conhecido com mais detalhes, podendo representar uma fonte importante de genes de importância agrícola.

## Agradecimentos

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

## Referências

- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Análise conjuntural de 2002**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 28 jan. 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.39, p. 88-93, 2003.
- KASCHUK, G. **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo**. 2003. 79 f. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods of Molecular Cell Biology**, Oxford, v.5, p.25-40, 1994.

# Avaliação da eficiência na fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja e caracterização genotípica e da diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*

---

Fernando Gomes Barcellos<sup>1</sup>; Pâmela Menna<sup>2</sup>; Jesiane Stefânia da Silva Batista<sup>3</sup>; Mariangela Hungria<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de pós-doutorado do CNPq; <sup>2</sup>Bolsista de mestrado da CAPES; <sup>3</sup>Bolsista de mestrado da Embrapa; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

A fixação biológica do nitrogênio (FBN), através da inoculação da soja com estirpes selecionadas de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tem sido essencial na viabilidade econômica da cultura no Brasil, dispensando o uso de adubação nitrogenada (Hungria et al., 2005). O uso das estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019) resulta em uma economia estimada em mais de 3 bilhões de dólares por safra (Hungria et al., 2005). Entretanto, devido ao constante aprimoramento das práticas agrícolas, ao lançamento de cultivares mais produtivas e adaptadas às diferentes condições ambientais, bem como ao estabelecimento de populações de estirpes em solos previamente inoculados, faz-se necessário uma constante busca por genótipos de *Bradyrhizobium* mais competitivos e eficientes no processo de FBN. Para esta busca é necessário um prévio conhecimento da diversidade genotípica existente em relação às estirpes de *Bradyrhizobium* atualmente utilizadas nos inoculantes, assim como àquelas populações existentes nos solos das regiões cultivadas, as quais passaram por um processo de seleção natural e adaptação.

O estudo comparativo entre genomas que diferem quanto à eficiência e competitividade na FBN constitui-se em uma estratégia importante para a elucidação das bases genéticas relacionadas a essas diferenças possibilitando, assim, uma busca mais eficiente por genótipos de desempenho



produtivo superior. O uso dos marcadores moleculares e os resultados obtidos a partir do seqüenciamento de genomas têm representado ferramentas importantes utilizadas nos estudos de diversidade e caracterização genotípica de inúmeros organismos. No gênero *Bradyrhizobium* existem muitos estudos de diversidade e caracterização genotípica com o uso de marcadores moleculares, constatando-se, em geral, variabilidade genética elevada (Lilly et al., 2001). Isso também foi constatado com estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas no Brasil (Silva, 2003). A diversidade obtida através desses marcadores pode ser utilizada na busca de seqüências gênicas relacionadas às diferenças existentes quanto à competitividade e eficiência na FBN, sendo essas seqüências posteriormente caracterizadas. O Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja possui uma coleção com cerca de 1.500 isolados naturalizados, microssimbiontes de soja, bem como 150 estirpes de *Bradyrhizobium* provenientes de diversas leguminosas hospedeiras. Visto que poucos laboratórios no mundo estão estudando bactérias deste gênero, bem como pela importância das mesmas na FBN, tanto para a cultura da soja, como para diversas leguminosas nativas, torna-se estratégica a identificação de regiões gênicas relacionadas à FBN, visando a busca de genótipos superiores quanto à eficiência na FBN. Do mesmo modo, também é importante identificar regiões gênicas associadas à competitividade e capacidade saprofítica das estirpes.

## Objetivos

Identificar e caracterizar genes relacionados à capacidade competitiva de estirpes e a eficiência na FBN com a cultura da soja, tomando como modelo estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*.

## Material e Métodos

Foram utilizadas 17 estirpes de *B. japonicum* provenientes da coleção do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja. Duas dessas estirpes são consideradas parentais, SEMIA 586 e SEMIA 566 e as de-

mais são variantes naturais dessas estirpes, obtidas após adaptação ao solo, isto é, vários anos após a inoculação do solo e cultivo da soja.

Foram desenvolvidas as seguintes atividades: Análise da eficiência de FBN das estirpes de *B. japonicum* escolhidas e inoculadas na soja; Amplificação por rep-PCR ("repetitive regions - polymerase chain reaction", com os "primers" BOX-A1R e REP) dos DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum*; PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism", polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), dos genes ribossomais 16S das 17 estirpes de *B. japonicum*; Agrupamento das estirpes *B. japonicum* segundo níveis de similaridade obtidos com a aplicação das técnicas de rep-PCR e PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S.

## Resultados

- Análise da eficiência da FBN das estirpes de *B. japonicum* escolhidas e inoculadas na soja

As plantas inoculadas com as 17 estirpes de *B. japonicum* foram avaliadas quanto à massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos formados na raiz (NN), massa dos nódulos secos (MNS), relação massa/número de nódulos (MSN/NN), nitrogênio total acumulado na parte aérea (NTPA) e eficiência dos nódulos (NTPA/MNS). Os experimentos foram realizados com três repetições e as médias agrupadas pelo teste de Tukey (SAS, 1989). As estirpes de *B. japonicum* pertencentes ao mesmo sorogrupo (sorogrupo SEMIA 566 ou sorogrupo SEMIA 586) não puderam ser agrupadas com relação aos parâmetros avaliados, pois dentro de cada sorogrupo foram encontradas estirpes mais e menos eficientes, com variações significativas em todos os parâmetros analisados (Tabela 1).

- Agrupamento das estirpes de *B. japonicum* segundo níveis de similaridade com base nos marcadores rep-PCR (com os "primers" BOX-A1R e REP) e PCR - RFLP dos genes ribossomais 16S:

Os DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum* foram amplificados por PCR ("polymerase chain reaction, reação em cadeia de polimerase") com o uso do "primer" BOX-A1R e REP. O gene ribossomal 16S foi amplificado

**Tabela 1.** Massa da parte aérea seca (MPAS, g/pl), número de nódulos (NN), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS, em mg/pl), relação massa/número de nódulos (MNS/NN), nitrogênio total acumulado na parte aérea (NTPA, mg N/pl) e eficiência dos nódulos (NTPA/MNS) das plantas de soja (cultivar BR 16) inoculadas com as 17 estirpes de *B. japonicum*.

Estirpe	MPAS	NN	MNS	MNS/NN	NTPA	NTPA/MNS
Sorogrupos SEMIA 566 .....						
SEMIA 566	3,1600bcdef	133,33a	381,13de	3,0193b	95,71bcd	0,25367ab
CPAC 15 (SEMIA 5079)	2,2533cdef	111,67a	335,17f	3,2170b	51,13de	0,15227bc
S 127	3,2867bcd	113,00a	629,87a	5,6232a	112,07bc	0,17784abc
S 340	1,9533ef	101,33a	382,10def	3,6966b	75,10bcd	0,19686abc
S370	3,4867bc	114,67a	449,20cdef	4,0655ab	115,65bc	0,26584a
S372	3,1033bcde	138,33a	452,37cdef	3,3741b	89,59bcd	0,19145abc
S478	2,7933bcde	113,00a	454,70cdef	4,0517ab	77,35bcd	0,17141abc
S490	3,4233bc	124,33a	560,30abc	4,5016ab	102,32bcd	0,18665abc
S516	2,0633def	120,33a	409,70cdef	3,5303b	55,28de	0,13999c
Sorogrupos SEMIA 586 .....						
SEMIA 586	3,3300bc	152,00a	487,50abcdef	3,2252b	99,88	0,20512abc
CPAC 7 (SEMIA 5080)	3,8600b	160,00a	538,97abcd	3,3686b	121,65b	0,22662abc
CPAC 390	2,4367cdef	101,33a	375,07ef	3,9515ab	66,65cd	0,18349abc
CPAC 392	3,5100bc	139,50a	527,35abcde	3,8423ab	86,97bcd	0,16393abc
CPAC 394	3,4900	115,00a	464,70bcdef	4,1120ab	86,55bcd	0,19090abc
CPAC 402	3,8700b	149,50a	580,25ab	3,8853ab	86,65bcd	0,14922bc
CPAC 403	3,2133bcd	141,00a	495,97abcde	3,5403b	75,32bcd	0,15408bc
CPAC 404	3,3950bc	144,50a	536,85abcd	4,5064ab	105,02bcd	0,19727abc

† Médias de três repetições e, quando seguidas da(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente pelo teste de Tukey P ? 0,05.

por PCR e o produto de amplificação submetido a clivagens com as enzimas de restrição *HhaI*, *HpaII* e *DdeI*. De acordo com os perfis de bandas apresentados, as estirpes foram agrupadas segundo níveis de similaridade. Com base nos índices de similaridade obtidos, com exceção das estirpes S 127 e CPAC 402, as estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo (sorogrupo SEMIA 566 ou sorogrupo SEMIA 586) foram semelhantes entre si, sendo possível distinguir os dois grupos. Já as estirpes S 127 e CPAC 402 apresentaram perfis de bandas distintos dos dois sorogrupos, apresentando índices de similaridade com as demais estirpes de 62,2% e 57,3%, respectivamente. Pelo seqüenciamento do gene 16S, constatou-se que a estirpe S 127 pertence, na verdade, à espécie *B. elkanii*, enquanto a CPAC 402 é uma estirpe de *Sinorhizobium sp.* Desse modo, o estudo sugere que ocorre transferência lateral de genes de FBN para rizóbios nativos do solo, o que está sendo confirmado pelo uso de outras técnicas moleculares.

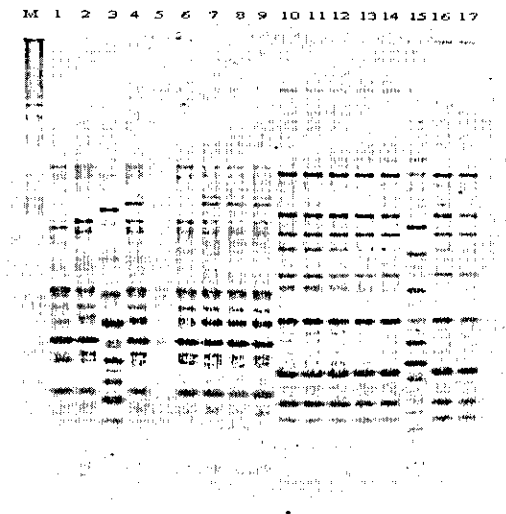


Figura 1. Amplificação por BOX-A1R PCR dos DNAs das 17 estirpes de *B. japonicum*. M - marcador de peso molecular (Ladder 1Kb plus); - 1 a 9: estirpes do sorogrupo SEMIA 566: SEMIA 566 e suas variantes CPAC 15 e S 127, 340, 370, 372, 478, 490, 516 respectivamente; 10 a 17: estirpes do sorogrupo SEMIA 586: SEMIA 586 e suas variantes CPAC 7,390, 392, 394, 402, 403 e 404.

## Considerações Finais

As metodologias de amplificação do DNA por rep-PCR , com os “primers” BOX-A1R e REP, bem como de PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S com três enzimas de restrição mostraram-se eficientes em estudos de diversidade genética, identificação de estirpes e monitoramento de estirpes de *Bradyrhizobium* no solo.

## Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq 301241/2004-0, 400710/2004-8) e pelo PRONEX. Os autores agradecem a Ligia Maria O. Chueire pelo apoio na condução das análises.

## Referências

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: GRAHAM, P. H. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).
- LILLY, M.S.; LOGANATHAN, P.; RANGARAJAN, S.; NAIR, S. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, p.276-281, 2001.
- SAS Institute. **SAS/STAT users guide**, Version 6, Vol. 2, 4th ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.
- SILVA, M.G.G. **Avaliação da diversidade genética de *Bradyrhizobium* pela análise de genes ribossomais**. 2003. 105 f. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## **Seleção de substrato artificial para criação de percevejos-pragas da soja**

---

Flávia Augusta Clochet da Silva<sup>1</sup>; Antonio Ricardo Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de mestrado da CNPQ na Embrapa; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

Percevejos da família Pentatomidae são considerados as principais pragas da soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae), no Brasil. Estudos sobre o comportamento reprodutivo desses insetos podem auxiliar no desenvolvimento de métodos de controle, além de dar suporte ao aprimoramento de técnicas de criação massal em laboratório.

Várias tentativas têm sido feitas para se criar percevejos em laboratório, utilizando-se dietas naturais (Sailer, 1952; Kobayashi, 1978; Kadosawa & Santos, 1980; Harris & Todd, 1981) ou dietas artificiais (Schell *et al.* 1957; Jensen & Gibbens, 1973; Kamano, 1980). Entretanto, na criação artificial de insetos, além da questão relacionada à dieta, há necessidade de se testar substratos artificiais para postura que, associados à dieta, podem permitir maiores avanços na técnica de criação de percevejos.

Em estudos com o percevejo verde, *Nezara viridula*, foi demonstrado que é possível utilizar modelos artificiais como substrato para oviposição, além desta metodologia apresentar facilidades no manuseio (Panizzi *et al.*, 2000).

Outra alternativa é o uso de extratos de plantas, obtidos a partir de folhas ou vagens de soja, que aplicados em substratos artificiais, mostram-se eficientes no condicionamento da oviposição de percevejos (Panizzi *et al.*, 2004). Entretanto, é preciso esclarecer melhor o efeito dos extratos de plantas de soja no comportamento da oviposição dos percevejos em substratos artificiais.

Os modelos artificiais visam substituir o ambiente natural, representando

um suporte valioso, principalmente para programas de pesquisa em controle biológico (Parra, 1992). Assim, o desenvolvimento de um substrato artificial, capaz de receber grandes quantidades de ovos de percevejos, facilitará a produção massal de parasitóides de ovos, contribuindo para o controle biológico de percevejos da soja.

Visando aprimorar as técnicas de criação massal de percevejos-pragas da soja, este trabalho objetiva estudar o comportamento de oviposição dos percevejos *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.) e *Piezodorus guildinii* (West.), em substratos artificiais, e avaliar a ação de extratos químicos de plantas de soja aplicados nestes substratos, condicionando a oviposição dos percevejos.

A pesquisa está sendo conduzida no Laboratório de Bioecologia de Percevejos da Embrapa Soja, localizada no município de Londrina, PR, e será desenvolvida entre março de 2005 e janeiro de 2009. Para os testes com substratos artificiais serão comparadas diferentes características físicas como: textura, tamanho, forma e cor. Nos testes com características químicas, serão comparadas diferentes concentrações de extratos de vagem de soja.

## Referências Bibliográficas

HARRIS, V.E.; TODD, J.W. 1981. Rearing the southern green stink bug, *Nezara viridula* with relevant aspects of its biology. J. Georgia Entomol. Soc. v.16, n.2, p.203-210.

JENSEN, R.L.; GIBBENS, J. 1973. Rearing the southern green stink bug on artificial diet. J. Econ. Entomol. v.66, n.1, p.269-271.

KADOSAWA, T.; SANTOS, H. 1980. Growth and reproduction of soybean pod bugs (Heteroptera) on seeds of legumes. Bull. Chogoku National Agric. Experm. Stat. n.19, p.75-97.

KAMANO, S. 1980. Artificial diet for rearing bean bug, *Riptortus clavatus* Thyn.. Jap. J. Appl. Entomol. Zool., v.24, p.184-188.

KOBAYASHI, T. 1978. Simple mass rearing method for the cabbage bug

*Erydema rugosum* Mots., using rape seeds. Jap. J. Appl. Entomol. Zool. v.22, n.3, p.185-1190.

PANIZZI, A.R.; BERHOW, M.; BARTELT, R.J. 2004. Artificial substrate bioassay for testing oviposition of southern green stink bug conditioned by soybean plant chemical extracts. Environ. Entomol. v. 33, n. 5, no prelo.

PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P.; SANTOS, C.H.; CARVALHO, D.R. 2000. Rearing the southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. Pesq. Agropec. Bras. v. 35, n. 9, p. 1709-1715.

PARRA, J.R.P. 1992. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. ESALQ, Piracicaba, SP. 137 p.

SAILER, R.I. 1952. A technique for rearing certain Hemiptera. United States Department of Agriculture Bureau of Entomology and Plant Quarantine, Gainesville, Flórida, v. E-T- 303, p. 1-5.

SCHELL, C.A.; BECK, S.D.; MEDLER, J.T. 1957. Nutrition of plant-sucking Hemiptera. Science. v. 125, p. 444-445.



# **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo em Campo Belo do Sul, SC**

---

Glaciela Kaschuk<sup>1,2</sup>; Julio C.P. Santos<sup>3</sup>; João F. Berton-Junior<sup>4</sup>; Mariangela Hungria<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Embrapa Soja; <sup>2</sup>Doutoranda sanduíche da Wageningen University, Holanda; <sup>3</sup>Prof. UDESC, Lages, SC; <sup>4</sup>Mestrando em Ciência do Solo, UDESC.

## **Introdução**

Pouco se conhece sobre a dinâmica de populações microbianas da rizosfera, especialmente nos trópicos, embora já existam diversas e modernas técnicas laboratoriais disponíveis para a condução desses estudos. A diversidade de grupos de microrganismos na rizosfera, por exemplo, rizóbios, poderia representar um bom indicador de qualidade do solo, porque estes respondem rápida e sensivelmente às mudanças ambientais do solo e estão presentes em grande densidade de população. Além disso, o maior conhecimento do efeito dos sistemas de manejo do solo sobre as variações populacionais dos rizóbios pode contribuir para o delineamento de estratégias para incrementar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo biológico fundamental à produção vegetal sustentável. Torna-se essencial verificar, particularmente em condições tropicais, o efeito do manejo do solo na diversidade microbiana, bem como se alterações na diversidade resultam em maior sustentabilidade agrícola.

## **Objetivos**

Caracterizar geneticamente rizóbios microssimbiontes de feijoeiro em áreas de plantio direto (PD), plantio convencional (PC) e campo nativo (CN) de Santa Catarina.

## Material e Métodos

As amostras de solo foram coletadas em áreas sob PD, PC e CN em uma propriedade rural de Campo Belo do Sul, SC. A área de PD foi cultivada com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), inoculados periodicamente, por 20 anos, sendo os últimos 10 anos sob PD. O teor de nutrientes foi corrigido e o pH foi ajustado para 5,5, segundo análise de solo. A área de PC foi explorada com agricultura por três anos. O pH também foi corrigido para 5,5, entretanto, o solo ainda apresentava algumas limitações de nutrientes, pois as produtividades foram inferiores àquelas obtidas no PD. Ambas as lavouras foram originalmente implantadas sobre o CN e receberam todos os tratamentos fitossanitários necessários. A área de CN vinha sendo utilizada com pecuária extensiva, sem fertilizantes ou implantação de leguminosas, apenas manejada com uso de fogo no inverno. O solo de cada área foi diluído sucessivamente até a diluição de  $10^{-5}$ . Uma alíquota de 1 mL dessa diluição foi, então, inoculada sobre sementes de feijoeiro (cv. Pérola), previamente desinfestadas, para o plantio em areia esterilizada. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação por 30 dias e coletadas para retirada dos nódulos. Nódulos foram escolhidos aleatoriamente e os rizóbios foram isolados (Vincent, 1970).

O DNA das bactérias foi extraído a partir de culturas puras de rizóbios em meio YMA, segundo procedimento otimizado (Kaschuk, 2003). O DNA foi amplificado pela técnica de PCR com o "primer" BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) e os seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 6 horas. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,00005%), observado em transluminador UV e fotografado. Essa técnica verificou a variabilidade genética em nível de estirpes. O polimorfismo foi analisado usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica) com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e tolerância de 2%.

O DNA também foi amplificado com "primers" que codificam a região do gene ribossomal 16S rRNA: Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCGTGGCGGC-3') e Y3 (3'-CTGACCCCAACTTCAGCATTGTTCCAT-5'). Os produtos dessas ampliações foram submetidas à metodologia de RFLP-PCR

(Laguerre et al., 1994), com as seguintes enzimas de restrição: *CfoI*; *HinfI*, *MspI*, *RsaI* e *MboI*. Os fragmentos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 3% e corridos em sistema de eletroforese a 120 V durante 4 horas. O polimorfismo foi analisado visualmente e uma letra diferente foi dada a cada perfil distinto, agrupando-se os perfis semelhantes em um mesmo grupo de espécie.

A comparação da diversidade de estirpes foi realizada pela distinção de perfis BOX A1R a 70% de similaridade e pelo cálculo dos índices de diversidade,  $H'$  (Shannon & Weaver, 1949), de riqueza genética,  $R1$  (Margalef, 1958) e de equidade,  $E$  (Pielou, 1977). Também foi construída uma curva acumulativa dos perfis para análise comparativa da variabilidade.

As estirpes utilizadas como referência foram CIAT 899 (*Rhizobium tropici* Tipo IIB), CFN 299 (*R. tropici* Tipo IIA), CFN 42 (*R. etli*), PRF 81 (*R. tropici*), H 152 (*R. giardinii* bv. *gallicum*) e R 602 (*R. gallicum* bv. *gallicum*).

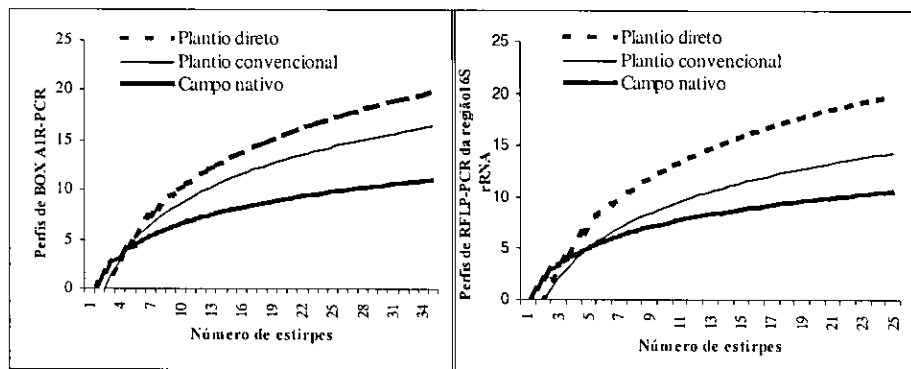
## Resultados e Discussão

As técnicas moleculares demonstraram grande diversidade genética de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro nos solos estudados. Pela amplificação do DNA por BOX A1R – PCR foram obtidos 35 perfis das estirpes isoladas do PD, 36 do PC e 20 do CN. Essas amplificações resultaram em um grau elevado de polimorfismo entre as bandas das três áreas de origem. Os dendrogramas demonstraram que as bactérias apresentavam baixa similaridade entre si. As estirpes dos dendrogramas do PD, PC e CN foram agrupadas em níveis de similaridade de apenas 17, 23 e 36% respectivamente (dados não mostrados). Poucas bactérias assemelharam-se às estirpes utilizadas como referência e a maioria apresentou perfil único.

Os perfis com 70% de similaridade na análise de BOX A1R – PCR foram agrupados e uma estirpe representante de cada grupo foi escolhida para a análise de RFLP-PCR da região 16S rDNA. Foram analisadas 24 estirpes de cada sistema de plantio e 12 do CN. Uma grande variedade de perfis foi observada, forte indicativo de diversidade genética elevada, bem como de várias espécies novas, ainda não estudadas.

A diversidade genética elevada observada é um forte indicativo de que muitas espécies de rizóbios dos solos tropicais ainda não foram descritas. Esta situação já havia sido diagnosticada anteriormente (Grange & Hungria, 2004). A escolha da simbiose com feijoeiro provou ser um excelente modelo para estudos de diversidade rizobiana nos solos tropicais. A alta diversidade é, provavelmente, relacionada à natureza promíscua do hospedeiro, que se associa a uma grande diversidade de rizóbios (Michiels et al., 1998).

Os índices de diversidade obtidos com os perfis de BOX A1R – PCR foram semelhantes nos sistemas PD ( $H'=2,96$ ,  $R1=6,47$  e  $E=0,93$ ) e PC ( $H'=3,02$ ,  $R1=6,42$  e  $E=0,95$ ), contudo, foram inferiores no CN ( $H'=2,35$ ,  $R1=3,67$  e  $E=0,94$ ). Os índices calculados com os perfis de RFLP – PCR da região do 16S rRNA evidenciaram diferenças de diversidade entre o PD ( $H'=3,12$  e  $R1=6,92$ ) e as demais áreas (PC:  $H'=2.86$  e  $R1=5.59$ ; CN:  $H'=2.09$  e  $R1=3.21$ ). O número acumulado de perfis indicou maior variabilidade genética no grupo de estirpes provenientes do PD e menor no grupo do CN, em ambas as comparações (estirpes com BOX A1R – PCR e espécies com RFLP – PCR) (Fig. 1).



**Figura 1.** Diversidade acumulada em função do número de rizóbios de feijoeiro avaliados e dos perfis obtidos com as técnicas de BOX A1R - PCR e RFLP - PCR da região 16S rDNA em áreas de lavoura de Campo Belo do Sul, SC sob os sistemas de plantio direto (PD), plantio convencional (PC) e campo nativo (CN).

## Considerações Finais

Neste estudo, a diversidade genética de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro foi superior no sistema PD, quando comparada ao sistema PC a ao CN. Os benefícios do PD em relação ao PC, em vários parâmetros microbiológicos, tem sido evidenciado (Hungria & Vargas, 2000) e os menores valores observados no CN resultam do manejo inadequado com fogo no inverno. A maior diversidade microbiana é importante por garantir que as funções dos microrganismos do solo sejam preservadas no ambiente, representando um “efeito tampão”. Os resultados indicam, ainda, a viabilidade de utilizar a diversidade genética de rizóbios com um indicador da qualidade do solo.

## Agradecimentos

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

## Referências

- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1389-398, 2004.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Dordrecht, v.65, p. 151-164, 2000.
- KASCHUK, G. **Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes sistemas de manejo de solo**. 2003. 79f. Tese. (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.

- MARGALEF, D.R. Information theory in ecology. **General Systems**, v.3, p.36-71, 1958.
- MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.193-205, 1998.
- PIELOU, E.C. **Mathematical Ecology**. New York: Wiley, 1977. 385 p.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949. 117 p.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods of Molecular Cell Biology**, Oxford, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p (IBP Handbook, n°. 15).

## Estudos da distribuição de percevejos, na planta de soja

---

Hellen Cristina Romagnolo Pereira<sup>1</sup>; Beatriz S. Corrêa-Ferreira<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Estagiária da Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

A soja desponta, cada vez mais, como um produto rentável, apesar dos altos custos para cultivá-la e dos sérios problemas enfrentados em função da presença de elevadas populações de percevejos-pragas, presentes nas lavouras.

Os percevejos fitófagos (Ordem Hemiptera), podem diminuir drasticamente a produção grãos, por se alimentarem dos mesmos, na fase de desenvolvimento e maturação, e inviabilizar a produção de sementes das lavouras atacadas (Villas Boas *et al.*, 1985).

As espécies mais abundantes são: *Euschistus heros* (Fabricius), *Piezodorus guildinii* (Westwood) e *Nezara viridula* (Linnaeus), embora várias outras também possam ser encontradas, em populações menores. Durante seu desenvolvimento, os percevejos passam pelas fases de ovo, ninfa, composta de cinco instares, e fase adulta.

Na planta de soja, os percevejos se deslocam para extratos mais ou menos expostos ao sol, em função dos diferentes horários do dia, observando-se diferenciação no comportamento das ninfas e dos adultos. O conhecimento dessa distribuição é fundamental para que as medidas de controle adotadas sejam mais eficientes.

Os danos à soja são causados, principalmente, por ninfas do 3° ao 5° instar e por adultos, sendo provocados pela introdução do aparelho bucal nas sementes.

A cultura da soja é colonizada pelos percevejos, a partir da pré-floração, alcançando o nível máximo durante o período de enchimento de grãos.

Após a maturação da soja, eles se deslocam para espécies de plantas hospedeiras (Panizzi & Slansky, 1985) que lhes fornecem alimento ou apenas refúgio (Panizzi, 1985).

## Objetivos

Com o objetivo de se conhecer a distribuição dos diferentes ínstares de desenvolvimento dos percevejos, na planta de soja, foi desenvolvido este trabalho, a nível de campo.

## Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, na safra 2004/05, durante o mês de março, em lavoura de soja com plantas na fase de enchimento de grãos à maturação.

Em cada data de amostragem, foi selecionado, ao acaso, um metro de fileira de soja. Essa unidade amostral foi dividida, com o auxílio de barbante e estacas de ferro, em três extratos: superior, mediano e inferior.

As unidades amostrais foram escolhidas, tanto na bordadura como no centro da lavoura, e realizadas em dez repetições. As leituras foram realizadas pela manhã, num período mais fresco (8h15' – 9h15') e a tarde (13h15' – 14h15') ; anotando-se a posição das massas de ovos, das ninfas e dos adultos das diferentes espécies de percevejos.

## Resultados e Discussão

As espécies presentes na área amostral foram: *E. heros* (79,8%), *P. guildinii* (12,1%), *N. viridula* (5%), *Edessa mediatubunda* (1,9%), *Thyanta perditor* (0,9%) e *Dichelops melacanthus* (0,3%).

Pelos resultados obtidos, constatou-se que a distribuição dos ovos e das diferentes fases de ninfas foram diferentes nas três partes da planta.

Nas unidades amostrais, constatou-se uma predominância de massas de



ovos de *E. heros*, onde 54,9% estavam presentes nas vagens e 45,1% nos folíolos, tanto na face superior como inferior.

Observou-se que as ninfas de primeiro e segundo instar predominaram na parte mediana da planta, tanto no período matutino como no vespertino. Na parte inferior das plantas foram observadas poucas ninfas, o que pode ser explicado pelas poucas folhas e vagens na região inferior da planta (Tabela 1), nessa fase de desenvolvimento da cultura da soja.

**Tabela 1.** Ocorrência média (%) de adultos e ninfas de diferentes espécies de percevejos, encontrados em plantas de soja, no município de Londrina, PR, 2004/05.

Período	Extrato	Adultos	Ninfas1-2	Ninfas3-5
Manhã	Superior	20	16,7	36,9
	Mediana	73,3	65,7	50
	Inferior	6,7	17,6	13,1
Tarde	Superior	49,1	9,6	25,7
	Mediana	49,1	63,5	65,7
	Inferior	1,8	26,9	8,6

Comportamento semelhante foi observado com as ninfas de terceiro ao quinto instar, que também distribuíram-se em maior quantidade na parte mediana, em relação às outras partes da planta. Observou-se, também, uma frequência maior de adultos na parte mediana da planta, encontrando-se 73,3% no período da manhã e 49,1% no período da tarde. Um número expressivo da população também foi observado na região superior da planta (20% e 49,1%, respectivamente) (Tabela 1).

Mais estudos da distribuição dos percevejos na planta de soja estão em andamento e novas observações serão realizadas na safra 2005/06.

## Referências Bibliográficas

PANIZZI, A.R. *Sebastiana aculeata*: nova planta hospedeira de

*Piezodorus guildinii* no Paraná. Pesq. Agropec. Bras. 20(10):1237-1238, 1985.

PANIZZI, A.R.; SLANSKY JR, F. Legume host impact of performance of adult *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). Env. Entomol. 14(3): 237-242, 1985.

VILLAS BÔAS, G.L.; MOSCARDI, F.; FERREIRA, B.S.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORSO, I.C.; PANIZZI, A.R. Indicações de manejo de pragas para percevejos. EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de soja, Londrina-PR, 1985, 15p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 9).

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

---

Jesiane Stefânia da Silva Batista<sup>1,2</sup>; Fernando Gomes Barcellos<sup>3</sup>; Pámela Menna<sup>1,2</sup>; Ieda Carvalho Mendes<sup>4</sup>; Mariangela Hungria<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Embrapa Soja; <sup>2</sup>UEL; <sup>3</sup>Bolsista CNPq; <sup>4</sup>Embrapa Cerrados.

### **Introdução**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), considerada a principal via de incorporação do N<sub>2</sub> à biosfera, é um processo realizado por certos organismos procariontes, dentre os quais bactérias da ordem Rhizobiales, que estabelecem uma relação simbiótica através da formação de estruturas altamente especializadas, denominadas nódulos, nas raízes de algumas plantas, principalmente da família Leguminosae. Nos nódulos, ocorre a conversão do N<sub>2</sub> atmosférico à amônia, pelas bactérias, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pela planta hospedeira.

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

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

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

## Objetivos

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

## Material e Métodos

### - Isolamento e crescimento das estirpes

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

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

### - Extração do DNA

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

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

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

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

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

#### - Perfil de PCR-RFLP do gene 16S rRNA

O DNA de cada amostra foi submetido à reação de PCR (“polimerase chain reaction”) com a finalidade de amplificar a região específica do gene 16S rRNA que possui, aproximadamente, 1.500 pares de bases. Uma solução ‘mix” foi preparada para a reação de amplificação, consistindo de dNTPs (0,3mM de cada base), tampão 10X, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimerase e os “primers” fD1 (5’ – cgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

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

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

## Resultados e Discussão

Foram reisoladas, no sexto ano do experimento, 263 estirpes, a partir dos nódulos da soja das parcelas que receberam inoculantes com estirpes de *B. japonicum*. Através de comparação dos padrões de restrição do gene 16S rRNA das estirpes reisoladas com as estirpes padrões, foi possível constatar que 62,73% das estirpes eram pertencentes ao sorogrupo da CPAC 15, confirmando a elevada habilidade competitiva e saprofítica dessa estirpe, que também é caracterizada por seus elevados índices de N<sub>2</sub> fixado, enquanto 11,02% das estirpes foram classificadas como pertencentes ao sorogrupo da CPAC 7. Além disso, 23,19% das bactérias isoladas foram classificadas como *B. elkanii*. Tal ocorrência pode ser atribuída a prováveis contaminações durante o experimento.

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

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

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

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

## Considerações Finais

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

## Agradecimentos

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

## Referências

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

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

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

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



## **Análise sensorial descritiva de extratos de soja em pó**

---

**Josemeyre Bonifácio da Silva<sup>1</sup>; Ilana Felberg<sup>2</sup>; Sandra Helena P. Ferreira<sup>3</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>4</sup>; Soo Young Lee<sup>5</sup>.** <sup>1</sup>Mestranda em Tecnologia de Alimentos, UEL; <sup>2</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos; <sup>3</sup>UEL; <sup>4</sup>Embrapa Soja; <sup>5</sup>University of Illinois, USA.

### **Introdução**

Um dos fatores que limitam a introdução e adoção direta da soja na dieta ocidental é devido aos sabores indesejáveis presentes nesta leguminosa. Os sabores de “feijão” cru ou ranço provavelmente, resultam da ação das enzimas lipoxigenases que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos livres poliinsaturados principalmente, os ácidos linoléico e linolênico, formando os hidroperóxidos; estes se decompõem em aldeídos, cetonas, ácidos e outros produtos secundários ou não, responsáveis pelos sabores característicos da soja e de seus produtos (AXEROLD et al., 1981). Já o gosto amargo e a adstringência são causados pelas saponinas (SHIRAIWA et al., 1991) e pelas isoflavonas (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999). Também, tem sido observado que a soja apresenta um sabor inerente e diferenciado para cada genótipo (PANIZZI, 1985), como é o caso da soja tipo hortaliça que possui sabor mais suave do que a comercial. Vários processos tecnológicos têm sido propostos para inativar as enzimas lipoxigenases diminuindo assim, os sabores indesejáveis da soja. Porém, a eliminação genética destas enzimas pode contribuir para o desaparecimento destes sabores (TORRES-PENARANDA et al., 1998). Para diminuir o desenvolvimento de compostos não voláteis causados pela presença de isoflavonas, alguns autores propõem o tratamento em água fervente contendo bicarbonato de sódio, para inativar as <sup>2</sup>-glicosidases, permitindo a obtenção de extrato solúvel de soja com gosto mais agradável. Na análise sensorial descritiva os provadores utilizam um vocabulário comum na caracterização dos produtos, porém, há uma grande dificulda-

de em descrever os atributos para produtos de soja conduzindo assim, a uma variedade de termos descritores como cru, capim, tinta, adstringente, entre outros. N'KOUKA et al. (2004) desenvolveram um vocabulário de termos descritores para extratos de soja, com o intuito de facilitar a descrição das características sensoriais do produto. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever sensorialmente extratos de soja comerciais e produzidos em laboratório a partir de cultivares desprovida de lipoxigenases e convencional e de uma linhagem tipo hortaliça, conforme o dicionário de termos descritores desenvolvido por N'KOUKA et al. (2004).

## **Material e Métodos**

### **- Preparo dos extratos**

Para o preparo dos extratos de soja em pó utilizaram-se grãos da cultivar convencional BRS 133, cultivar BRS 213, desprovida das isoenzimas lipoxigenases 1, 2 e 3 e da linhagem BRM94 52273, obtida do cruzamento entre um cultivar comercial e uma cultivar tipo hortaliça, fornecidos pela Embrapa Soja, Londrina/Paraná. Os extratos foram produzidos conforme metodologia proposta por FELBERG et al. (2004), na Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro. Também, foram utilizados dois extratos de soja em pó comerciais adquiridos em um supermercado de Londrina/Paraná.

### **- Análise Sensorial Descritiva**

Nove provadores da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, EUA, foram selecionados após, executarem um teste de reconhecimento de gostos básicos e um para o reconhecimento da solução de n-propil-tiouracil e de sua intensidade. O levantamento dos atributos sensoriais foi realizado com o auxílio do dicionário de termos descritores para extratos de soja em pó desenvolvido por N'KOUKA et al. (2004). Após, várias sessões em grupo e consenso entre a equipe sensorial, chegou-se a lista final dos atributos descritores: gosto amargo, adstringente e doce; aroma nasal e textura de amido; recobrimento da boca e densidade; aroma nasal de grão cozido, de soja tostada, de algodão doce, de peixe, de ranço e de

sementes de gergelim; aroma retronasal de soja tostada, de grão cozido, de sementes de gergelim e de malte. Para o treinamento, os provadores realizaram duas sessões com a lista de atributos por eles gerada e com as amostras de referência e, então, seguiu-se para avaliação das amostras em cabines individuais.

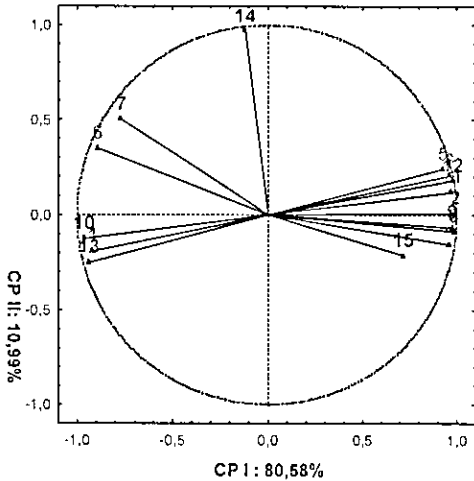
#### - Análise Estatística

O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados, com 5 amostras de extratos de soja, 9 provadores e 2 repetições. Os resultados do estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste F ajustado considerando como fonte de variação as amostras para os atributos que apresentaram valores obtidos entre amostras x provadores significativos (STONE & SIDEL, 1993). Também, foi conduzido o teste t (LSD) de comparação de médias para os atributos cujos valores calculados de  $F_{amostras}$  e  $F_{amostras}$  ajustado eram significativos. Uma Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada considerando-se os atributos que apresentaram valores obtidos de  $F_{amostras}$  e  $F_{amostras}$  ajustado significativos.

## Resultados

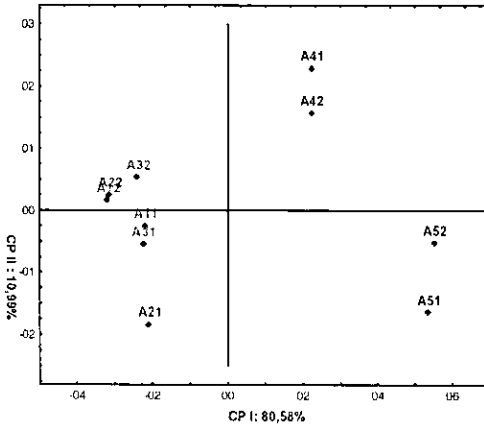
Os resultados da análise de variância (ANOVA) indicaram diferenças entre a interação amostras x provadores para os atributos: aroma nasal de amido, de soja tostada, de ranço, de algodão doce, de sementes de gergelim e de peixe; aroma retronasal de soja tostada, de sementes de gergelim e de malte; gosto adstringente e doce. Foi então, conduzido o teste F ajustado para estes atributos que mostrou, diferenças estatísticas entre as amostras para aroma nasal de soja tostada, de ranço, de sementes de gergelim e de peixe; aroma retronasal de soja tostada, de sementes de gergelim e de malte e gosto amargo. Após o teste também, foi verificado que os atributos aroma nasal de amido e adstringência permaneciam idênticos entre as amostras. O teste t (LSD) foi conduzido para verificar as diferenças entre as amostras. Não foi encontrada diferença entre os extratos produzidos em laboratório para os atributos aroma nasal de grão cozido, de soja tostada, de ranço, de algodão doce, de sementes de gergelim e de peixe; aroma retronasal de grão cozido, de soja tostada,

de sementes de gergelim e de malte. Estes extratos apresentaram maior intensidade para o aroma nasal de grão cozido e de algodão doce; aroma retronasal de grão cozido e de malte. Os extratos comerciais 1 e 2 diferiram dos extratos obtidos das cultivares e da linhagem por apresentarem maior intensidade dos atributos aroma nasal de soja tostada, de ranço, de sementes de gergelim e de peixe. O extrato comercial 2 mostrou-se diferente de todos os demais extratos em estudo e manifestou maior intensidade para os atributos aroma retronasal de soja tostada e sementes de gergelim. Os extratos comerciais 1 e 2 foram caracterizados pela maior intensidade de gosto amargo e menor intensidade para gosto doce que os extratos produzidos em laboratório. Não foi observada diferença entre o extrato comercial 2 e os extratos da cultivares para o atributo relativo à densidade. Quanto à textura de amido, o comercial 2 não diferiu do extrato da linhagem tipo hortaliça. A análise de componentes principais foi realizada para os atributos sensoriais que apresentaram  $F_{amostras}$  e  $F_{amostras}$  ajustado significativos. Na Figura 1 A está apresentada a projeção dos atributos sensoriais sobre o plano fatorial (CPI x CPII) e na Figura 1 B, a projeção das amostras de extratos de soja. O primeiro componente principal (CPI) explicou 80,58% da variação total existente entre as amostras, e o segundo componente principal (CPII) explicou 10,99%, totalizando 91,57% de explicação. A porcentagem de 80,58% da variabilidade entre as amostras, explicadas no primeiro componente principal (CPI), são devido ao fato das amostras variarem em relação aos atributos aroma nasal de grão cozido, de soja tostada, de ranço, de sementes de gergelim, de algodão doce e de peixe; aroma retronasal de grão cozido, de soja tostada, de sementes de gergelim e de malte, gosto doce e amargo e textura de amido. A variabilidade explicada no segundo componente principal (CPII), é devido à variação entre as amostras com relação ao atributo densidade. Na Figura 1 B, cada amostra de extrato de soja foi representada por um losângulo (A1, A2, A3, A4 e A5). Quando as repetições da avaliação de cada amostra estão próximas, significa que houve boa repetibilidade da avaliação. Somente a avaliação da amostra do extrato de soja da cultivar BRS 133 (A21 e A22), não apresentou boa repetibilidade. As amostras localizadas mais à esquerda na Figura 1 B (extratos de soja obtidos em laboratório), apresentaram maior intensidade dos atributos aroma nasal



(A) Legenda

Aroma nasal: 1 = grão cozido; 2 = soja tostada; 3 = ranço; 4 = sementes de gergelim; 5 = peixe; 6 = algodão doce.  
 Aroma retronasal: 7 = grão cozido; 8 = soja tostada; 9 = sementes de gergelim; 10 = malte  
 Gosto com prendedor de nariz: 11 = amargo.  
 Gosto: 12 = amargo; 13 = doce.  
 Textura: 14 = densidade; 15 = amido.



(B) Legenda

A11 e A12 – cultivar BRS 213, repetição 1 e 2  
 A21 e A22 – cultivar BRS 133, repetição 1 e 2  
 A31 e A32 – linhagem BRM94 - 52273, repetição 1 e 2  
 A41 e A42 – comercial 1, repetição 1 e 2  
 A51 e A52 – comercial 2, repetição 1 e 2

Figura 1. Projeções dos atributos sensoriais (A) e das amostras de extratos de soja (B) sobre o plano fatorial (CPI x CPII)

de grão cozido e de algodão doce, aroma retronasal de grão cozido e de malte e gosto doce. Já as amostras dos extratos comerciais 1 e 2 localizados mais à direita (Figura 1 B) demonstraram maior intensidade dos atributos de aroma nasal de soja tostada, de ranço, de sementes de gergelim e de peixe; aroma retronasal de soja tostada e de sementes de gergelim;

gosto amargo e textura de amido. No segundo CP, o principal atributo, foi de densidade (Figura 1 A), indicando que a amostra localizada mais acima (extrato comercial 2) apresentou maior intensidade deste atributo.

## Considerações Finais

Os extratos obtidos das cultivares BRS 213 e BRS 133 e da linhagem BRM94 - 52273 foram caracterizados sensorialmente, pelos atributos aroma nasal de grão cozido e de algodão doce; aroma retronasal de grão cozido e de malte e gosto doce, indicando sabor mais suave. Não diferiram entre si quanto ao aroma nasal de grão cozido, de soja tostada, de ranço, de algodão doce, de sementes de gergelim e de peixe; aroma retronasal de grão cozido, de soja tostada, de sementes de gergelim e de malte; gosto amargo e doce e densidade. No processamento dos extratos ocorreu a inativação das enzimas lipoxigenases devido ao tratamento térmico, tornando-os assim, iguais quanto à ausência de lipoxigenases. Os extratos comerciais foram qualificados pelos atributos aroma nasal e retronasal de soja tostada e de sementes de gergelim, aroma nasal de ranço, gosto amargo e textura de amido, sugerindo sabor mais desagradável que os extratos produzidos em laboratório. Diferenças significativas foram evidentes entre os extratos obtidos em laboratório e os comerciais, o que pode ser devido aos processamentos diferenciados podendo ou não incluir a inativação de lipoxigenases.

## Referências Bibliográficas

- AXEROLD, B.; CHEESBROUGHT, T.M.; LAAKSO, S. Lipoxigenase from soybean. **Methods. Enzymol.**, v.71, p. 441-451, 1981.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. DEL-PINO; FERREIRA, S.H.P.; OLIVEIRA, M.C.N.; KITAMURA, K. Effects of isoflavones on beany flavor and astringency of soymilk and cooked whole soybeans grains. **Pesq. Agrop. Bras. (PAB)**, Brasília, v.34, n.6, p.1045-1052, 1999.
- FELBERG, I.; CORNEJO, F.E.P.; NASCIMENTO, R.E.; PONTES, S.M.; CABRAL, L. C. **Obtenção de Extrato de Soja Integral em Pó Formula-**

**do com Sacarose.** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2004. Xp. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 69). No prelo.

N'KOUKA, K.D.; KLEIN, B.P.; LEE, S.Y. Developing a Lexicon for Descriptive Analysis of Soymilk. **J. Food Sci.** v. 69, n.7, p. 213-217. 2004.

PANIZZI, M.C.C. **Potencial for narrow leaves in vegetable soybeans.** Gainesville, University of Florida. Tese de Mestrado, 55p, 1985.

SHIRAWA, M.; HARADA, K.; OKUBO, K. Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity. **J. Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.2, p.323-331, 1991.

TORRES-PENARANDA, A.V.; REITMEIER, C.A.; WILSON, L.A.; FEHR, W.R.; NARVEL, J.M. Sensory Characteristics of Soymilk and Tofu made from Lipoyxygenase-Free and Normal Soybeans. **J. Food Sci.**, v.63, n.6, p.1084-1087, 1998.

## Teste de Elisa para a determinação da ocupação nodular

---

Giovana Bortoti<sup>1</sup>; Kellen Banhos do Carmo<sup>1</sup>; Alexandre José Cattelan<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Aluna da UNIFIL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um teste sorológico que visa identificar e quantificar o antígeno reconhecido pelo antissoro (imunoglobulina) que lhe deu origem, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado às propriedades colorimétricas.

A coloração do meio ocorre devido à ação de certa enzima sobre um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina. Atualmente, existem várias formas de se aplicar o ELISA (Clark e Bar-Joseph, 1984). Várias enzimas são citadas para a obtenção de conjugados. A sensibilidade do método de ELISA pode ser aumentada pelo uso de substratos fluorogênicos, como o fosfato 4-metil-umbeliferil. Substratos radioativos também podem ser utilizados, no entanto exigem equipamentos mais sofisticados e maior atenção.

No laboratório de microbiologia do solo da Embrapa Soja o teste de Elisa é utilizado para identificar espécies *Bradyrhizobium* spp.

### Objetivo

Verificar através do teste de Elisa quais estirpes de *Bradyrhizobium* spp, bactérias fixadoras de nitrogênio, estão presentes em nódulos de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos.

### Material e métodos

- Produção de antissoro



O antígeno foi produzido a partir das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080. Crescidos em meio sólido; suspensos em 1ml de solução salina e centrifugados (1000 rpm, 10 min). Descartou-se sobrenadante, adicionou 1 ml de sol. salina, repetiu-se novamente e na 3ª vez adicionou-se 0,5 ml de sol. salina e agitou. Aqueceu-se em banho-maria a 100°C por 15 min. Completou para 1 ml com solução tampão de cobertura. Manteve em geladeira (4°C, usar em questão de dias). Com o antígeno pronto, fez-se a imunização do animal a fim de produzir o antissoro. O animal escolhido foi o coelho, pois, eles permitem retirar quantidades suficientes de sangue, além de serem de fácil manuseio. O esquema de imunização usado é de injeções intramusculares. Após a injeção do antígeno, ocorrem diferentes reações no sistema imunológico do animal, incluindo a produção de anticorpos. A imunização segue o cronograma descrito abaixo.

O animal chega no biotério e fica três dias em observação para se verificar sua saúde. O início da imunização deve ocorrer numa sexta-feira, onde se aplica o antígeno + adjuvante completo. Nos dias em que não há aplicação deve-se sempre verificar a situação do coelho. A próxima aplicação será na quarta-feira seguinte onde se aplica antígeno + adjuvante incompleto. Após quatro dias, uma nova aplicação de antígeno + adjuvante incompleto. Três dias após, aplica-se antígeno + adjuvante incompleto, espera-se mais quatro dias e aplica-se pela última vez antígeno + adjuvante incompleto. Cinco dias depois, no período da tarde, retira-se a ração para que no dia seguinte pela manhã se faça a sangria. Existem dois métodos de sangria: a punção Cardíaca e pela orelha. Na punção Cardíaca é feita somente uma coleta de sangue, retirada diretamente do coração por uma seringa esterilizada. Em seguida, aplica-se 10 a 15 ml de éter no mesmo local, causando a morte instantânea. A sangria pela orelha ocorre na veia marginal da orelha. Usa-se xilol para dilatar a veia, fazendo-se o corte com lâmina de barbear. O método mais indicado é o de punção cardíaca, pois além de causar menos sofrimento para o animal, a quantidade de soro obtido é maior.

Quando o período de imunização e coleta chegam ao fim é necessária a limpeza do biotério. A amostra de sangue coletada terá como fim, a realização dos testes de título e reação cruzada.

O teste do título dos antissoros têm como o objetivo determinar se a concentração de anticorpos do soro está alta ou baixa. Tem-se como início a diluição deste antissoro começando em 1/100 até 1/51200. O diluente usado é PBS-Tween. Primeiro pipetar 10 ul de antissoro em um tubo com 990 ul de PBS-Tween (1/100), retiram-se 500 ul deste tubo e distribuem-se nos outros tubos até obter a última diluição (para isso repete-se 10 vezes). O título é determinado através da preparação de uma placa de Elisa, tendo as bactérias presentes juntamente com as diluições dos antissoros, seguindo-se a metodologia descrita por Fuhrmann & Wollum (1985). Repousar por uma noite e no dia seguinte fazer a leitura do título no espectrofotômetro. Após a determinação do título, escolher as diluições para utilizar no teste de reação cruzada. Este teste tem o objetivo de verificar se há possibilidade de uma bactéria reagir com o antissoro de outra. A placa é montada com as diluições escolhidas. Depois da montagem da placa, incubar em geladeira à 4°C por uma noite. No dia seguinte, lavar uma vez, adicionar 100 ul de tampão substrato com o reagente Phosphatase Substrate, deixar repousar à temperatura ambiente de 30 a 50 min. e observar a reação colorimétrica do antissoro com o seu específico antígeno. Fazer leitura em leitor para placas de Elisa.

Se os teste de título e de reação cruzada tiverem resultado positivo, terá então o início dos testes nodulares. O antígeno nodular é preparado da seguinte forma: - esmagar os nódulos em tubos plásticos com 0,5 ml de salina (flambar as pinças entre os nódulos); - Aquecer em banho-maria a 100°C por 15 min.; - completar para 1 ml com tampão de cobertura. Após a preparação dos antígenos começa uma seqüência de procedimentos para realização do Elisa: 1ª Etapa – Incubação de cobertura (período da tarde), pipetar 100 ul de antígeno por compartimento da placa (pipetar para um número de compartimento igual ao número de antissoros sendo testados), incubar à temperatura ambiente por 1 hora, esvaziar a placa e secar, lavar com PBS-Tween por 4 vezes, secando bem entre as lavadas. 2ª Etapa – pipetar 100 ul de antissoro com o título corrigido por compartimento, a diluição do antissoro se dará com PBS-Tween, cobrir as placas e incubá-las a 28°C por 1 hora e, em seguida, lavar como anteriormente. 3ª Etapa - adicionar 100 ul do conjugado diluído 5000x em PBS-Tween, incubar em geladeira 4°C durante a noite, lavar como em 1. 4ª Etapa –

adicionar 100 ul de solução fresca de substrato contendo 1 mg de substrato por ml de tampão para substrato, incubar a temperatura ambiente por 30 a 50 min. ou até a cor amarela das reações positivas aparecer, fazer a leitura em leitor para placas de Elisa, absorvância de 405 nm, caso a leitura não possa ser feita imediatamente, adicionar 3 gotas de NaOH 3M por compartimento.

## Resultados

Têm-se através do teste de Elisa a determinação da ocupação nodular das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. presentes em plantas de soja, o qual sua função é proporcionar uma maior fixação biológica de nitrogênio no solo. Após identificação nodular, outros trabalhos serão elaborados afim de garantir a total eficiência das estirpes para a plantação de soja.

## Referências Bibliográficas

- CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. **Methods in virology**. New York: Academic Press, 1984. P51-85
- FUHRMANN, J.J.; WOLLUM II, A.G. Simplified enzyme-linked immunosorbent for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.1010-1013, 1985.

# Panorama genômico da estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, recomendada para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja

---

Leandro Pereira Godoy<sup>1</sup>; Ligia Maria de Oliveira Chueire<sup>2</sup>; Fernando Gomes Barcellos<sup>3</sup>; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos<sup>4</sup>; Luiz de Paula Gonzaga<sup>4</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>4</sup>; Mariangela Hungria<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de Mestrado da Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja; <sup>3</sup>Bolsista de pós-doutorado do CNPq; <sup>4</sup>Laboratório Nacional de Computação Científica.

## Introdução

A cultura da soja se beneficia do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), dispensando o uso de N de fertilizantes nitrogenados. Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para uso nos inoculantes comerciais, duas pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (recomendada no período de 1968 a 1975 e, novamente, desde 1979) e a SEMIA 5019 (=29w), recomendada desde 1979 e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a CPAC 15 e a CPAC 7, que vêm sendo utilizadas desde 1992. Essas quatro estirpes são capazes de fornecer N para as cultivares de soja mais produtivas recomendadas atualmente, permitindo a obtenção de rendimentos superiores a 4.000 kg/ha (Hungria et al., 2005).

A estirpe CPAC 15 (= SEMIA 5079, =566a, =DF 24) pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566. Em relação ao histórico da SEMIA 566, muitos inoculantes americanos empregados na década de 1960 não se mostraram eficientes e, então, foi realizado o isolamento da estirpe adaptada SEMIA 566 (= BR 40) (SEMIA, Seção de Microbiologia Agrícola), que pode ser considerada como uma das primeiras estirpes brasileiras. A SEMIA 566 foi isolada em 1966, de um nódulo da cultivar Hardee, em vaso de Leonard que havia recebido inoculante americano distribuído pela firma Dixie Inoc, provavelmente um inoculante da Nitragin (Milwaukee, E.U.A.),

quando se buscava superar problemas de nodulação a campo com essa cultivar. A CPAC 15 é uma variante natural da CPAC 15, obtida a partir do reisolamento em solos do DF, de estirpes vários anos após a sua última inoculação, quando se buscava isolados adaptados com elevada capacidade de FBN e com alta competitividade (Hungria et al., 2005).

A estirpe SEMIA 566, bem como sua variante CPAC 15 são, sem dúvida, as mais competitivas estabelecidas em solos brasileiros. Essa estirpe pertencente ao mesmo sorogrupo da USDA 123 (=311b123, =TAL 376, =ACCC15036), que foi isolada em 1960 de um nódulo de soja em Iowa, nos E.U.A., sendo considerada indígena naquele país. As estirpes relacionadas sorologicamente ao sorogrupo USDA 123 sorogrupo têm sido consideradas como as mais competitivas da região do meio-oeste dos E.U.A., ocupando, caracteristicamente, de 60% a 80% dos nódulos formados, sendo muito difícil introduzir novas estirpes em solos com estirpes desse sorogrupo (Hungria et al., 2005).

No Brasil, há relatos de que, nos primeiros dois anos, a SEMIA 566 e a CPAC 15 apresentam baixa competência saprofítica, contudo, logo depois se estabelecem fortemente. Relatos semelhantes foram feitos para a USDA 123 nos E.U.A., sugerindo que a estirpe deva residir no solo por um determinado período antes de dominar os nódulos. Um exemplo dessa capacidade foi, recentemente, mostrado por Mendes et al. (2004), em um ensaio conduzido por sete anos na Região dos Cerrados. No quarto e sexto anos desse experimento, como conseqüência da dispersão, estirpes do sorogrupo SEMIA 566 foram encontradas em todas as parcelas, mesmo naquelas que haviam sido inoculadas com outras estirpes, onde chegou a ocupar mais de 50% dos nódulos.

A importância de determinação dos genes dessa estirpe com alta competitividade e capacidade elevada de FBN reside em que, com o lançamento de cultivares de soja mais produtivas, o uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos que já receberam inoculantes anteriormente, existe a necessidade de selecionar estirpes mais eficientes e competitivas, bem como de conhecer melhor o genoma das estirpes estabelecidas nos solos brasileiros, visando prever o seu comportamento e as respostas à inoculação.

## Objetivo

Realizar a cobertura de 10% a 15% do genoma da estirpe CPAC 15 de *Bradyrhizobium japonicum*, procurando genes relacionados à capacidade saprofítica, competitividade e eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio.

## Material e Métodos

Construção de biblioteca genômica de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC15

### - Extração de DNA genômico

Até o presente momento, foi feita uma biblioteca da CPAC 15. Os "pellets" foram obtidos de células da CPAC 15, crescidas em meio de cultura contendo extrato-de-levedura e manitol a 28 °C, por sete dias e, então, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min. O DNA genômico das bactérias foi extraído utilizando, para o rompimento da parede celular, degradação de proteínas, polissacarídeos, restos de parede e RNA, os reagentes SDS, proteinase-K, fenol, clorofórmio e RNase. Após a purificação, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

### - Construção de bibliotecas

O preparo da biblioteca "shotgun" envolveu a purificação do DNA e a fragmentação deste DNA ao acaso, por meio mecânico (nebulização). O DNA misturado com glicerol 50% e NaOAc 3M foi nebulizado por 30 segundos a uma pressão de 2 kgf/cm<sup>2</sup>, a fim de obter fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 3 kb. A fragmentação foi confirmada em gel de agarose 1%. Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Os fragmentos de 3 a 5 kb foram separados em gel de agarose "low melting", grau analítico. Após recuperação dos fragmentos a partir do gel de agarose, os mesmos foram colocados para se ligarem ao vetor pUC18 digerido com a enzima de restrição *Sma*I-BAP e defosforilados com a enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe DH10B, através da técnica de

eletroporação. As células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani contendo ampicilina (100 µg/mL, previamente esterilizada com filtro 0,2 µm), IPTG e X-gal e as bactérias foram crescidas durante a noite a 37 °C.

#### - Seqüenciamento

No processo de seqüenciamento, colônias brancas individuais (clones recombinantes) foram inoculadas em placas de crescimento de cultura com 96 poços contendo meio "Terrific Grow" (12 g/L de bactotripton, 24 g/L de extrato de levedura e 4 mL/L de glicerol) e ampicilina (100 µL/mL). As bactérias foram crescidas com agitação de 150 rpm, a 37 °C, "overnight". As placas de crescimento de cultura foram utilizadas para estoque em glicerol (80%), sendo então reinoculadas em blocos de crescimento, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Após o crescimento, foram obtidos "pellets" por centrifugação a 4.000 rpm por 8 minutos. O DNA foi, então, extraído pelo método de rompimento alcalino. Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes foram seletivamente precipitados com KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4 °C, pH 4,7-4,9). O sobrenadante foi filtrado por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) e o DNA obtido através da filtração é purificado e ressuspendido em água, verificando a concentração em gel de agarose 1%.

O DNA precipitado foi seqüenciado utilizando o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso", para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

#### - Montagem do genoma

As leituras obtidas são submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC, com o programa SABIÁ, que integra vários programas de domínio público: "phred", "phrap", "Consed", "phrapview" e permite a identificação de ORFs ("open reading frames") como os programas "Glimmer", BLAST, KEGG, COG, INTERPRO e PSORT.

## Resultados

O projeto iniciou em janeiro de 2005 e uma primeira biblioteca foi obtida e validada. Foi construída uma “homepage” para o projeto ([www.bnf.Incc.br](http://www.bnf.Incc.br)) e os resultados obtidos até o presente momento constam dos Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Leituras do genoma de *B. japonicum* CPAC 15.

Número total de leituras	625
Número total de leituras sem vetores (<= 10% vector)	563
Número de leituras com 10-80% de bases de vetores	46
Número de leituras com mais de 80% de bases de vetores	16

**Tabela 2.** Bases obtidas no genoma de *B. japonicum* CPAC 15.

Número de bases depositadas (pb) (excluindo os vetores, incluindo bases de baixa qualidade)	627.090 (100%) (? 0,07% do genoma, estimado em 9 milhões de pb)
Número de bases com qualidade elevada >= 20 (pb)	309.709 (46,70%)
Número de bases com qualidade >=30 (pb)	243.682 (36,75%)
Número de bases com vetores (pb)	36.057 (5,44%)
Comprimento médio (pb)	1003,34
Média de comprimento (qualidade >=20) (pb)	495,53
Cobertura do genoma	151.083 (? 1,67%)

## Considerações Finais

A estratégia de construção e validação das bibliotecas foi confirmada e deverá permitir a cobertura parcial do genoma da estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*.



## Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento parcial do Projeto (50.5499/2004-5, 50.5946/2004-1 e 301241/2004-0).

## Referências

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., Ed. Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).

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

## **Dinâmica da matéria orgânica em vários sistemas de manejo e rotação de culturas em Londrina**

---

Letícia C. Babujia<sup>1</sup>; Thais P. Correa<sup>1</sup>; Rosinei A. Souza<sup>2</sup>; Júlio Cezar Franchini<sup>3</sup>.  
<sup>1</sup>Estudante de graduação da UEL; <sup>2</sup>Mestranda em Química Ambiental da UEL;  
<sup>3</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

O sistema de plantio direto (PD) tem sido amplamente adotado no Brasil, onde atualmente já ocupa 22 Mha (FEBRAPDP, 2005). Em comparação com o plantio convencional (PC), o PD aumenta a retenção de umidade do solo, diminui a oscilação de temperatura do solo e a erosão pela água e pelo vento, melhora a estrutura e, com o tempo, aumenta a matéria orgânica do solo (MOS), muitas vezes resultando em maiores produtividades (Castro Filho et al., 2002; Derpsch et al., 1991; Bayer et al., 2002; Amado et al., 2001; Sá et al., 2001). Além disso, o PD pode representar um papel importante na redução do aquecimento global por permitir uma maior retenção de CO<sub>2</sub> e economizar até 40% do trabalho humano e do uso de combustíveis fósseis em comparação com o PC (Derpsch et al., 1991; Kladvko, 2001; Bayer et al. 2002).

Alguns estudos têm demonstrado que a rotação de culturas é essencial para que todos os benefícios do PD possam ser alcançados, especialmente em relação ao acúmulo de carbono. Neste contexto, o uso de leguminosas em sistemas de rotação de culturas se destaca como prática essencial, embora na realidade ainda seja pouco utilizada (Amado et al., 2001; Bayer et al., 2002).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento do carbono e nitrogênio do solo em resposta ao cultivo e a rotação de culturas com quantidades variáveis de gramíneas e leguminosas.

## Desenvolvimento

O ensaio de campo foi estabelecido em 1997 na estação experimental da Embrapa soja, em Londrina. O experimento foi desenhado para comparar os efeitos dos sistemas de plantio direto e convencional e rotação de culturas incluindo culturas de grãos (soja, milho e trigo) e culturas de cobertura (tremoço e aveia preta). Os sistemas de rotação são apresentados na tabela 1. O ensaio tinha um delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições.

**Tabela 1.** Sistemas de rotação de culturas utilizados nos sistemas de manejo do solo.

Rotações	Inverno 97	Verão 97/98	Inverno 98	Verão 98/99	Inverno 99	Verão 99/00	Inverno 2000	Verão 00/01	Inverno 01	Verão 01/02
1	Aveia	Milho	Aveia	Soja	Trigo	Soja	Tremoço	Milho	Aveia	Soja
2	Aveia	Soja	Tremoço	Milho	Aveia	Soja	Trigo	Soja	Tremoço	Milho
3	Aveia	Soja	Trigo	Soja	Tremoço	Milho	Aveia	Milho	Trigo	Milho

As determinações dos estoques de C e N foram feitas no quinto ano do experimento. Foram coletadas em trincheiras amostras deformadas e indeformadas nas camadas de 0-10, 10-20 e 20-40 cm de profundidade. As amostras indeformadas foram coletadas com cilindros de aço de 100 cm<sup>3</sup>. Três amostras foram coletadas por camada e secas a 105°C para determinação da densidade do solo (Blake, 1965). O carbono orgânico foi determinado indiretamente após oxidação com dicromato na presença de ácido sulfúrico a 170°C por 30 minutos e determinação espectrofotométrica do Cr<sup>3+</sup> formado. Na curva padrão foi utilizado C-sucrose. O N-total foi determinado após digestão das amostras com ácido sulfúrico na presença de sulfato de cobre e potássio e determinação espectrofotométrica do NH<sub>4</sub>-N usando o método do azul de indofenol (Feije & Anger, 1972). A densidade do solo foi considerada para os cálculos dos estoques de C e N que foram expressos em kg m<sup>-2</sup> para cada camada de solo.

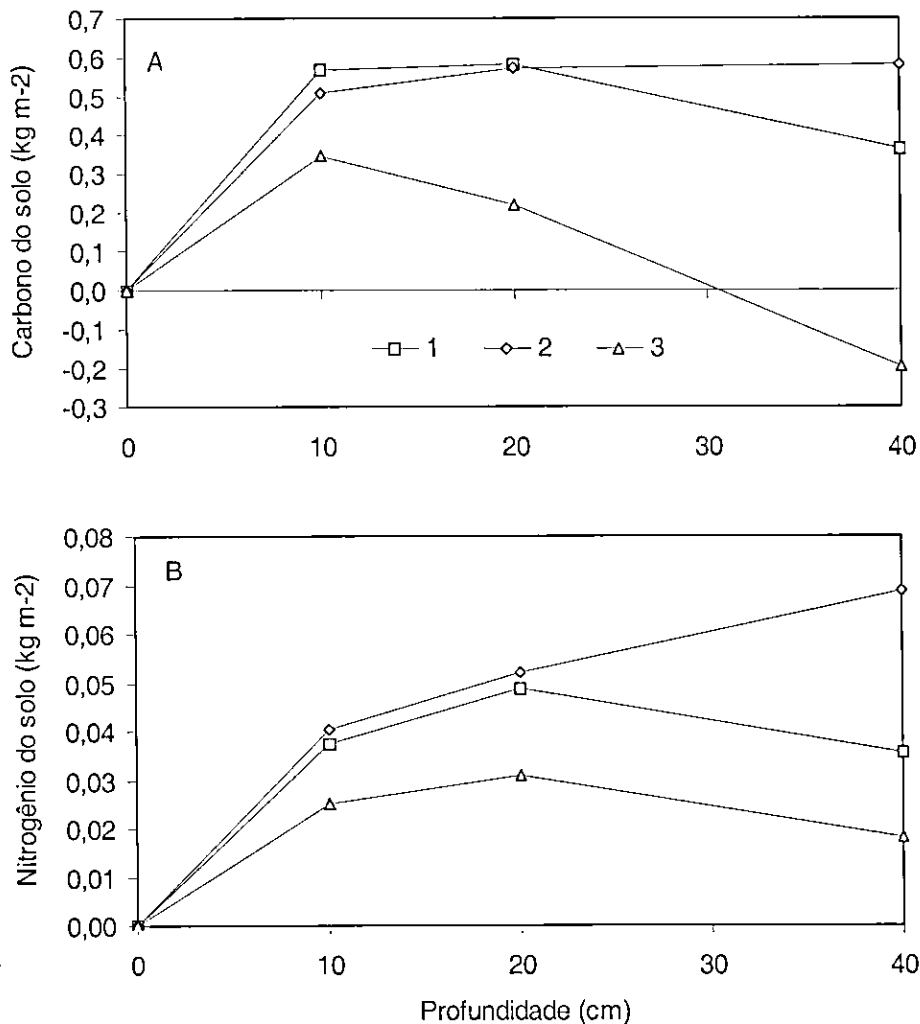
## Resultados

O manejo do solo afetou os estoques de C orgânico, os quais variaram com a profundidade do solo. As camadas de 0-10 e 20-40 cm mostraram as maiores diferenças entre os sistemas de manejo, com a primeira acumulando maiores quantidades no PD e a segunda no PC. O C orgânico no PD apresentou as seguintes mudanças líquidas em relação ao PC: +0,476, -0,019 e -0,207 kg m<sup>-2</sup>, nas camadas de 0-10, 10-20 e 20-40 cm, respectivamente. Entretanto, embora o PD acumulou mais C na superfície e menos em profundidade, considerando o perfil todo analisado (0-40), um balanço de +0,250 kg C m<sup>-2</sup> foi obtido no PD, correspondendo a 2.500 kg C ha<sup>-1</sup> acumulado nos período de cinco anos, ou 500 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

Os estoques de carbono também variaram com o sistema de rotação de culturas e as mudanças líquidas na camada de 0-40 cm foram: +0,363, +0,584 e -0,197 kg C m<sup>-2</sup> nas rotações 1, 2 e 3, o que equivaleu a 726, 1.167 e -394 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados para os estoques de N. Em média, a comparação entre PD e PC resultou nas seguintes mudanças líquidas de N: +0,034, +0,010 e -0,003 kg m<sup>-2</sup> nas camadas de 0-10, 10-20 e 20-40 cm, respectivamente. Deste modo, as principais diferenças entre os sistemas de manejo foram observadas na camada superficial. Considerando o perfil todo (0-40 cm), um aumento de 0,041 kg N m<sup>-2</sup> foi obtido no PD, representando 410 kg de N ha<sup>-1</sup>, ou 82 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. As rotações de culturas também afetaram a acumulação de N no PD e para a camada de 0-40 cm, mudanças de +0,036, +0,069 e +0,018 kg N m<sup>-2</sup> foram observadas nas rotações 1, 2 e 3, equivalendo a 71, 137 e 37 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os dados obtidos nesse estudo mostram que a predominância de leguminosas na rotação 2 favoreceu o acúmulo de C no PD, enquanto o uso de culturas comerciais e de cobertura não leguminosas, favoreceu o acúmulo no PC. Os resultados indicam também, que a acumulação de C no PD em relação ao PC com a inclusão de leguminosas resultaria da maior taxa de mineralização da MOS no PC do que propriamente de maior acúmulo no PD.



**Figura 1.** Mudanças líquidas de C (A) e N (B) do solo entre os sistemas PD e PC em diferentes sistemas de rotação de culturas em função da profundidade do solo. 1, 2 e 3 se referem a aveia, tremoço e trigo, respectivamente, conforme seqüência de culturas dos sistemas de rotação descritos na Tabela 1.

## Referências

- AMADO, T.J.C.; BAYER, C.; ELTZ, F.L.F.; BRUM, A.C.R.. 2001. **Potencial de culturas de cobertura em acumular carbono e nitrogênio no solo no plantio direto e a melhoria da qualidade ambiental.** R. Bras. Ci. Solo 25, 189-197.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R.. 2002. **Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil.** Plant Soil 238, 133-140.
- BLAKE, G.R., 1965. BULK DENSITY. IN: BLACK, C.A., (Ed.), **Methods of Soil Analysis, Part II, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin**, pp. 374-390.
- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARAES, M.F.; FONSECA, I.C.B.. 2002. **Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the State of Parana, Brazil.** Soil Till. Res. 65, 45-51.
- DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U.. 1991. **Controle da Erosão no Paraná, Brasil: Sistemas de Cobertura do Solo, Plantio Direto e Preparo Conservacionista do Solo.** GTZ-IAPAR, Eschborn, Germany-Londrina, Brazil, 272 pp.
- FEBRAPDP (Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha), 2005. Available from <<http://www.febrapdp.org.br/br%20evolucao%20pd%2093-01.htm>>, Retrieved on the 28<sup>th</sup> of March 2005.
- FEIJE, F.; ANGER, V.. 1972. **Spot test in inorganic analysis.** Anal. Chem. Acta 149, 363-367.
- KLADIVKO, E.J.. 2001. **Tillage systems and soil ecology.** Soil Till. Res. 61, 61-76.
- SÁ, J.C.M.; CERRI, C.C.; DICK, A.; LAL, R.; VENSKE-FILHO, S.P.; PICCOLO, M.C.; FEIGL, B.E.. 2001. **Organic matter dynamics and carbon sequestration rates for a tillage chronosequence in a Brazilian Oxisol.** Soil Sci. Soc. Am. J. 65, 1486-1499.

## **Relações públicas como ferramenta estratégica no relacionamento entre a Embrapa Soja e os seus diversos públicos**

---

Flávia Monti Arone<sup>1</sup>; Ludmila Maia Mendes<sup>1</sup>; Gilceana Soares Moreira Galerani<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Estudantes de graduação da UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Apresentação**

O gerenciamento da comunicação entre as organizações e seus públicos é considerado uma das principais funções de Relações Públicas. Entretanto, um estudo profundo da área demonstra que seu campo de atuação é amplo e está de acordo com o tipo, os objetivos, a finalidade e a política da empresa na qual está inserido.

A Embrapa Soja está ligada a vários grupos interessados direta ou indiretamente às ações de pesquisa de soja. Esses grupos possuem expectativas e desejos diferentes. Por isso, torna-se necessário um constante trabalho de seu mapeamento e sua classificação como públicos, para assim realizarem-se trabalhos que tentem corresponder às necessidades desses segmentos.

Nesse contexto, a Área de Comunicação Empresarial da Embrapa Soja (ACE) atua estrategicamente como colaboradora em proporcionar um ambiente empresarial satisfatório junto aos seus diversos públicos, fato que se concretiza, principalmente através de um planejamento de comunicação adequado. O foco deste trabalho baseia-se no desenvolvimento das atividades produzidas no estágio de Relações Públicas realizado pelas estudantes do terceiro e quarto anos desse curso na Universidade Estadual de Londrina.

## Objetivo

Divulgar o papel estratégico da atividade de Relações Públicas no desenvolvimento institucional da Embrapa Soja.

## Desenvolvimento

Para ser titulada como ferramenta estratégica, as Relações Públicas devem estar inseridas em um cenário de projeções, e prognósticos, ou seja, elementos decorrentes do planejamento. Kunsch (2003) afirma que "o exercício da função estratégica de relações públicas só é possível por meio do planejamento, pois o gestor de comunicação ou profissional de relações públicas nas organizações contemporâneas precisa ir além das técnicas".

Para testar a veracidade dessa afirmação, propõe-se um roteiro para o planejamento que será utilizado, expondo melhor as ações realizadas na Embrapa Soja, em específico durante este estágio de Relações Públicas, no que tange à área de comunicação e ao trabalho com seus diversos públicos. Seguem as etapas propostas.

- Pesquisa: etapa que abrange desde a identificação da situação e o levantamento de dados do que se deseja realizar até a construção do diagnóstico referente ao ambiente estudado. Para o planejamento de comunicação anual da Embrapa Soja, foi efetuada uma pesquisa de opinião interna que coletou conceitos, sugestões e críticas dos empregados da empresa, para assim serem concretizadas ações que atendam às expectativas do público interno. Para eventos em geral, é feito um levantamento do público alvo e das condições externas.
- Planejamento: com os dados coletados, definem-se os objetivos e as metas a alcançar com determinadas ações e a definição dessas estratégias. Será nessa fase que ocorrerá a seleção dos meios de comunicação, a verificação dos recursos necessários e disponíveis e, principalmente, a obtenção do apoio da direção, no caso da Embrapa Soja, o apoio da chefia. Cita-se como exemplo prático, a elaboração de um concurso fotográfico direcionado ao público interno da instituição, o qual foi produzido desde a escolha do nome do concurso até a formulação



do regulamento com datas, prêmios e informações pertinentes, assim como os veículos de divulgação.

- Implantação: considera-se fundamental, nesta etapa, a divulgação ao público alvo do que foi planejado. Para isso, faz-se necessário elaborar ações que causem impacto e interesse nos grupos envolvidos no plano de ação. Além disso, essa é a fase de monitorar as atividades desenvolvidas, para possíveis ou necessárias correções.
- Avaliação: a última etapa do planejamento estratégico proposta por Kunsch (2003) é a mensuração dos resultados obtidos com as atividades planejadas e implementadas. Entretanto, é importante ressaltar que ela não está sempre ao final de todo o processo e sim deve ser realizada durante todas as fases, para medir a efetividade das ações. Na Embrapa Soja, esse mecanismo é utilizado por meio de instrumentos de pesquisa de avaliação que indicam a satisfação do público ao qual o programa foi dirigido. Para isso, cria-se o instrumento adequado, aplica-se, tabulam-se e analisam-se os dados obtidos para serem repassados à chefia e aos demais interessados. Eventos como seminários, workshops, estandes, Dia de Campo, entre outros, foram avaliados nos aspectos de organização, divulgação, materiais de apoio, atendimento ao público do evento e conteúdos apresentados.

Através desse processo, que não necessariamente segue uma ordem cronológica, busca-se o planejamento estratégico da comunicação empresarial e a aceitação dos grupos envolvidos com a organização, neste caso a Embrapa Soja e os seus diversos públicos. Além das atividades citadas, desenvolvidas em cada uma das fases, o estágio de Relações Públicas proporciona o trabalho com veículos de comunicação dirigida, como a elaboração e a manutenção do mural temático da empresa e o atendimento aos públicos interno e externo, possibilitando aprimoramento das funções a serem desempenhadas pelo profissional de Relações Públicas.

## **Considerações Finais**

A partir do exposto, compreende-se que, por meio do planejamento estra-

tégico as Relações Públicas podem alcançar, de modo mais efetivo, suas metas e seus objetivos. Esse aspecto que se confirma com a aplicação dos preceitos teóricos de autores como Kunsch (2003), aos planos e projetos desenvolvidos pela Área de Comunicação Empresarial da Embrapa Soja.

Sendo assim, a possibilidade fé os estagiários de Relações Públicas auxiliarem no desempenho de atividades estratégicas de relacionamento com diferentes públicos da empresa é de fundamental importância. Isso permite a aplicação das técnicas estudadas, além da construção da visão crítica do processo de comunicação e do papel da atividade de Relações Públicas no desenvolvimento institucional das organizações.

## Referências

CHIAVENATO, I. **Introdução à teoria geral da administração**. São Paulo: Campus, 2004. 494p.

FORTES, W.G. **Relações Públicas: processo, funções, tecnologia e estratégias**. Londrina: UEL, 1998. 327p.

KUNSCH, M.M.K. **Planejamento de relações públicas na comunicação integrada**. 4ed. Ver., atual. E ampl. São Paulo: Sumus, 2003. 417p.

## Identificação de QTL associados à fixação biológica do nitrogênio em soja

---

Maria Aparecida dos Santos<sup>1,4</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>2,4</sup>; Taila Carolina Santini Vedovati<sup>3,4</sup>; Mariangela Hungria<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de mestrado da CAPES; <sup>2</sup>Bolsista de DTI do CNPq; <sup>3</sup>Bolsista de IC do CNPq; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

Dentre os principais fatores bióticos que contribuem para a elevada produção de soja no Brasil, destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Estudos indicam que a FBN pode suprir todo o N que a soja necessita. A não utilização de fertilizantes nitrogenados na cultura da soja resulta em uma economia estimada em US\$ 3 bilhões, por safra, para o Brasil (Hungria et al., 2005). Todavia, os caracteres da FBN não têm sido contemplados diretamente nos programas de melhoramento genético da soja. Estes têm priorizado características relacionadas com a produção e a resistência à doenças. Diferenças, quanto à eficiência no processo de FBN, entre os genótipos comerciais de soja que são utilizados atualmente nos programas de melhoramento foram relatadas por Bohrer & Hungria (1998) e Hungria & Bohrer (2000).

Marcadores moleculares, identificados no mapa genômico da soja (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004), vêm sendo utilizados para a identificação de QTL (locos de caráter quantitativo). Utilizando marcadores do tipo microssatélites seqüências simples repetidas (SSR), Meksem et al. (2001) identificaram regiões genômicas relacionadas com a produção de isoflavonóides. Marcadores de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e SSR também foram utilizados para mapear QTL envolvidos com o incremento no teor de proteínas nos grãos (Sebolt et al., 2000). Diversos QTL para características relacionadas com o rendimento de grãos também foram descritos (Chung et al., 2003).

Com relação à FBN, Nodari et al. (1993) detectaram quatro QTL afetando o número de nódulos em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Na soja, Nicolás

et al. (2005) identificaram, em uma população de 160 famílias  $F_{2,3}$  do cruzamento BRS 133 (baixa capacidade de FBN) x Embrapa 20 (média capacidade de FBN), 16 associações significativas entre marcadores SSR e QTL para parâmetros de crescimento e nodulação das plantas.

## Objetivo

Identificar QTL relacionados à capacidade de fixação biológica do nitrogênio em soja.

## Material e Métodos

Cento e cinquenta e sete linhagens  $F_{2,7}$  endogâmicas recombinantes de soja, derivadas do cruzamento entre as cultivares Bossier (alta capacidade de FBN) e Embrapa 20 (média capacidade de FBN) foram avaliadas, em casa de vegetação, quanto às características relacionadas com o crescimento da planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e à nodulação (massa de nódulos secos, MNS; número de nódulos, NN; e massa média de nódulos secos, MNS/NN). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com oito repetições de cada linhagem. Cada planta no estádio V2, recebeu 1 mL de inoculo misto (v:v 1:1) de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. elkanii* SEMIA 587. Trinta dias após a inoculação, as plantas foram coletadas individualmente e determinaram-se os parâmetros: MPAS, NN, MNS e a relação MNS/NN. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (Tabela 1). A herdabilidade para cada característica foi calculada pela fórmula:  $h^2 = \sigma^2g / [\sigma^2g + (\sigma^2e/r)]$ .

O DNA genômico das 157 linhagens  $F_{2,7}$  e dos parentais também foram amplificados com 24 pares de "primers" microssatélites, escolhidos a partir do mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999; Song et al., 2004).

A existência de ligação entre um loco marcador e um caráter quantitativo foi determinada por análise de regressão simples. A ligação foi admitida quando constatada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre o valor fenotípico médio das linhagens  $F_{2,7}$  e o marcador (Tabela 2). A proporção da varia-

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN, nas linhagens F<sub>2.7</sub> do cruzamento Bossier x Embrapa 20.

Variável	QM	GL	F	P	R <sup>2</sup>	CV (%)	H <sup>2</sup>
MPAS	17,1176	156	1,98	0,0001	0,2280	25,60	49
NN	16.831,6510	156	1,44	0,0008	0,1768	50,12	30
MNS	210.989,8000	156	1,49	0,0002	0,1822	49,85	33
MNS/NN	4,1040	156	1,37	0,0034	0,1695	45,60	27

**Tabela 2.** Marcadores SSR significativamente associados com as diferenças fenotípicas, (massa da parte aérea seca (MPAS), número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e relação MNS/NN).

Característica quantitativa	Marcador	Grupo de ligação <sup>1</sup>	Nível de significância do teste F	R <sup>2</sup> (%)	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> <sup>2</sup> (Bossier)	A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> <sup>2</sup> (Embrapa 20)
MPAS (mg.pl <sup>-1</sup> )	Satt332	LG B1	0,0100	3,70	11,19b	11,76a
	Satt434	LG H	0,0300	3,10	11,18b	11,72a
	Satt232	LG L	0,0050	5,00	11,84a	11,20b
NN (Nódulo.pl <sup>-1</sup> )	Satt197	LG B1	0,0500	2,50	207,47a	222,27b
	Satt509	LG B1	0,0040	5,25	203,19b	224,93a
	Satt307	LG C2	0,0025	6,20	228,58a	205,28b
	Satt325	LG F	0,0160	3,80	229,88a	209,67b
MNS (mg.planta <sup>-1</sup> )	Satt202	LG C2	0,0220	3,30	783,00a	718,30b
	Satt307	LG C2	0,0005	8,00	802,51a	706,90b
MNS/NN	Satt296	LG D1b	0,0300	3,00	3,71b	3,98a
	Satt192	LG H	0,0300	3,80	3,93a	3,68b
	Satt509	LG B1	0,0500	2,50	3,93a	3,69a

<sup>1</sup> Grupo de ligação como descrito em Cregan *et al.* (1999).

<sup>2</sup> Médias alélicas do marcador associadas aos parentais Bossier (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>) e Embrapa 20 (A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>). Nas linhas, os valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey P?0,05.

ção fenotípica explicada pelo marcador foi estimada, utilizando-se o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) (Edwards *et al.*, 1987).

## Resultados e Considerações Finais

Foram identificados sete marcadores (Satt192, Satt197, Satt202, Satt296, Satt307, Satt332 e Satt509) relacionados à nodulação e três (Satt232, Satt332 e Satt434) associados à produção de biomassa da planta. Desse marcadores, os Satt192, Satt197, Satt232, Satt296, Satt307, Satt332 e Satt509 já haviam sido identificados em uma população  $F_{2:3}$  originada do cruzamento Embrapa 20 (média capacidade de FBN) x BRS 133 (baixa capacidade de FBN) (Nicolás et al., 2005). Estes marcadores têm potencial para utilização em programas de melhoramento de soja visando o desenvolvimento de genótipos com maior FBN.

## Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq 400710/2004-8 e 301241/2004-0) e pelo PRONEX. A Rinaldo Benedito Conceição, Lígia Maria O. Chueire e Manuel P. da Silva, funcionários da Embrapa soja, pelo apoio técnico.

## Referências

- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 937-953, 1998.
- CHUNG, J.; BABKA, H.L.; GRAEF, G.L.; STASWICK, P.E.; LEE, D.J.; CREGAN, P.B.; SHOEMAKER, K.C.; SPECHT, J.E. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1053-1067, 2003.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1464-1490, 1999.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers,

genomic distribution and types of genes action. **Genetics**, Maryland, v. 116, p. 113-125, 1987.

HUNGRIA, M.; BOHER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).

MEKSEM, K.; NJITI, V.N.; BANZ, W.J.; IQBAL, M.J.; KASSEM, M.A.; HYTEN, D.; YUAN, J.; WINTERS, T.A.; LIGHTFOOT, D.A. Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Sylvania v. 1, p. 38-45, 2001.

NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C.A.A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, 2005.

NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GUZMÁN, R.L.; GILBERTSON, R.L.; GEPSTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean III. Genetics factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v. 134, p. 341-350, 1993.

SEBOLT, A.M.; SHOEMAKER, R.C.; DIERS, B.W. Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1438-1444, 2000.

SONG Q.J.; MAREK, L.F.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J.E.; CREGAN, P.B. A new integrated linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v 109, p. 122-128, 2004.

# Biologia da lagarta-da-soja em dieta enriquecida com diferentes concentrações de rutina e genistina

---

Mariana C. Salvador<sup>1</sup>; Sandra H. Miyakubo<sup>1</sup>; Sérgio Henrique da Silva<sup>1</sup>; Maria Cristina Neves de Oliveira<sup>1</sup>; Clara Beatriz Hoffmann-Campo<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Estagiários da Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

*Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) também conhecida como lagarta-da-soja é uma das principais pragas desfolhadoras da soja, e no Brasil encontra-se distribuída em praticamente todas as áreas de cultivo. O uso indiscriminado de inseticidas para o controle desta praga aumenta as agressões ambientais, causando desequilíbrio no início do desenvolvimento da cultura. Assim, outras técnicas de controle estão sendo pesquisadas e a resistência de plantas é uma das alternativas.

Os mecanismos de defesa da planta abrangem uma série de características morfológicas e, também, um complexo de substâncias químicas, que podem torná-la repelente, tóxica ou, de algum modo, inadequada para os insetos-praga (PIUBELLI 2004). Na soja, as substâncias de defesa mais prováveis são os flavonóides (HOFFMANN-CAMPO 1995) e, dentre eles, a rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) é reconhecida por desempenhar papel importante na defesa da planta a lepidópteros (HOFFMANN-CAMPO et al, 2001). Esta substância foi identificada em extratos de folhas de PI 227687, PI 274454 e outros poucos genótipos resistentes a insetos (PIUBELLI et al, 2005). Adicionalmente, o isoflavonóide genistina (genisteína 7-O-β-D-glicosídeo) foi observado em menor concentração na maioria dos genótipos estudados por PIUBELLI, et al (2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica da interação das substâncias químicas rutina (quercitina 3-O-rutinosídeo) e genistina em populações de *A. gemmatalis*.



## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Resistência de Plantas e Fitoquímica da Embrapa Soja, em Londrina, PR. Rutina (Sigma) e a genistina, obtida por um processo de cristalização e recristalização (M. A. Berhow, com. pessoal), a partir de um concentrado de isoflavonas da marca Novasoy, cedido pela ADM (Archer Daniels Midland Co), foram utilizadas nos bioensaios.

**Cristalização:** Para a cristalização, 20g de concentrado de isoflavonas (Novasoy) foi solubilizado em 1000ml de MEOH e aquecido sob agitação até 50°C, quando adicionou-se 100ml de H<sub>2</sub>O destilada. Após esfriar completamente, a solução foi colocada na capela em repouso até a precipitação dos cristais de genistina e filtrado. O líquido resultante foi deixado em Becker semiaberto por aproximadamente 12h e, novamente, filtrado.

**Recristalização:** A pureza dos precipitados foi monitorada através da análise em HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) e o precipitado com maior teor de genistina, foi solubilizado em MEOH, até a obtenção de uma solução clara e transparente. Esta solução foi aquecida sob agitação até atingir 50°C, quando adicionou-se 10% de H<sub>2</sub>O destilada. O processo de cristalização (evaporação e precipitação), foi repetido, até que se obtivesse acima de 95 % de genistina.

As substâncias rutina 0,25g (R<sub>1</sub>) e 0,50 g (R<sub>2</sub>), genistina 0,017g (G<sub>1</sub>) e 0,034g (G<sub>2</sub>), a mistura das duas substâncias 0,25g de rutina + 0,017g de genistina (R+G), foram adicionadas quando a dieta artificial atingiu 40°C. Dieta normal, sem adição de nenhuma substância foi considerada testemunha. A concentração de genistina foi corrigida para 100% de pureza.

As lagartas provenientes do laboratório de criação massal da Embrapa Soja, foram criadas desde a emergência em suas respectivas dietas e, na pré muda para o 3º instar, foram pesadas e individualizadas em copos de acrílico com tampas de papelão esterilizadas. A dieta contida em cada copo foi pesada antes e após o consumo. Os copos foram colocados em bandejas com tampa para evitar perda de umidade da dieta, e mantidas

em B.O.D. com fotofase de 12h, temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e umidade de  $70 \pm 10\%$ . As lagartas foram observadas diariamente, avaliando a mortalidade e o tempo de alimentação de cada estágio.

Para a obtenção do fator de correção peso fresco/seco, cinco indivíduos foram pesados, mortos e secos em estufa por (72h,  $60^\circ\text{C}$ ) e novamente pesados. O valor obtido foi multiplicado pelo peso fresco de cada lagarta do bioensaio. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo do peso seco da dieta oferecida aos insetos. A dieta remanescente nos copos foi separada das fezes, sendo ambas secas em estufa (72h,  $60^\circ\text{C}$ ). A quantidade de dieta consumida pelas lagartas foi obtida, subtraindo-se do peso seco inicial da dieta corrigido, a quantidade de dieta restante nos copos.

As pré-pupas foram individualizadas em copos com vermiculita e mantidas sob condições controladas de temperatura, luz e umidade. Após 48h da transformação, as pupas foram pesadas (peso fresco) e transferidas para estufa (72h,  $60^\circ\text{C}$ ) e, novamente, pesadas (peso seco).

A análise de covariância (ANCOVA) proposta por RAUBENHEIMER & SIMPSON (1992) seguida de diagramas bicoordenados de utilização (RAUBENHEIMER & SIMPSON, 1994) foram utilizados para estimar o crescimento (peso de pupa ajustado pelo tempo de alimentação), consumo alimentar (dieta consumida ajustada pelo tempo de alimentação), eficiência na assimilação (peso de fezes ajustado pelo consumo) e conversão dos alimentos ingeridos em biomassa (peso de pupa ajustado pelo consumo). Todas as análises de covariância foram realizadas utilizando-se os pesos secos das variáveis.

## Resultados e Discussão

A mortalidade observada em *A. gemmatilis* segundo o teste  $\chi^2_{(5, 0.05)}$  ocorreu em função dos diferentes tratamentos, e morreram respectivamente, 34,28% e 25,70% dos insetos alimentados de dietas  $R_2$  e  $R+G$ .

O tempo de alimentação total foi afetado pelos diferentes tratamentos. Na testemunha,  $G_1$  e  $G_2$ , o desenvolvimento das lagartas foi mais rápido.

Nos demais tratamentos observou-se um prolongamento no ciclo larval do inseto. As populações alimentadas em dieta  $R_1$ ,  $R_2$  e R+G apresentaram período de alimentação mais longo, comparado aos demais tratamentos. Para equilibrar o baixo aproveitamento nutricional e custos metabólicos a que são submetidos, os insetos alongam seu ciclo para atingir o peso ideal necessário para a fase de pupa e posterior reprodução (PIUBELLI 2004). Porém, desta forma ficam suscetíveis aos fatores naturais de mortalidade, por um período maior.

Os maiores pesos secos iniciais de lagartas (0,68; 0,59 e 0,67) e de pupa (61,56; 58,15 e 57,08) foram observados quando os insetos se alimentaram das dietas  $G_2$ ,  $G_1$  e testemunha, respectivamente, sugerindo que os tratamentos  $G_1$  e  $G_2$  não apresentam nenhum efeito antinutricional ou repelente aos insetos. No entanto, na menor concentração, misturada com rotina, observou-se o menor peso de pupa, comparável àquele, obtido pelas lagartas alimentadas com a dieta  $R_2$ .

Lagartas alimentadas de dietas contendo a maior concentração de genistina  $G_2$  consumiram a maior quantidade de dieta (302,28mg). Provavelmente, devido a *A. gemmatalis* estar acostumada com esta substância, que além das folhas, está também presente nos grãos de soja; a proteína de soja faz parte da composição da dieta artificial utilizada para a criação das lagartas. Os insetos alimentados com dieta  $R_2$  também consumiram grande quantidade de dieta (290,51g) mas, apresentaram o menor crescimento (peso de pupa ajustado pelo tempo de alimentação), provavelmente por terem sido menos eficientes na conversão do alimento ingerido em biomassa (peso de pupa ajustado pelo consumo) e na assimilação dos alimentos (peso de fezes ajustado pelo consumo). Assim, observou-se que mesmo aumentando o consumo (dieta consumida ajustada) pelo tempo de alimentação, as lagartas não apresentaram proporcional aumento no peso. Esses fatos evidenciam que os insetos falharam em detectar rotina na dieta, pois o consumo não foi afetado pela adição do flavonóide. As lagartas alimentadas de dieta R + G consumiram menos que  $R_2$ , mas foram mais eficientes na conversão do alimento ingerido. Porém, o peso seco de pupa, o peso de fezes e o tempo de alimentação não diferiram significativamente do tratamento  $R_2$ .

## Referências

- HOFFMANN-CAMPO, C.B. Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner). **Ph.D. Dissertation, The University of Reading, Reading, 165p. 1995.**
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; J.B. HARBONE; A.R. MCAFFERY. 2001. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomol. Exp. Applic.* 98: 181-194.
- PIUBELLI, G.C; HOFFMANN Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais. Curitiba-PR. Tese Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2004
- PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C de. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*. *J. Chem. Evol.* 31 (7): 1515-1531.
- RAUBENHEIMER, D.; S.J. SIMPSON. 1992. Analysis of covariance: an alternative to nutritional indices. *Entomol. Exp. Appl.* 62: 221-231.
- RAUBENHEIMER, D.; S.J. SIMPSON. 1994. The analysis of nutrition budgets. *Funct. Ecol.* 8: 783-791.

## Uso de marcadores moleculares em soja visando identificar caracteres da fixação biológica do nitrogênio

---

Michele Asai<sup>1,4</sup>; Maria Aparecida dos Santos<sup>2,4</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>3,4</sup>; Mariangela Hungria<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica do CNPq; <sup>2</sup>Bolsista de mestrado da CAPES; <sup>3</sup>Bolsista de DTI do CNPq; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e reprodução das plantas, sendo um fator limitante as culturas, conseqüentemente, a agricultura moderna utiliza fertilizantes nitrogenados, o que eleva os custos de produção, além de ser fonte de contaminação ambiental. No entanto, algumas plantas são capazes de utilizar o nitrogênio molecular ( $N_2$ ), que constitui cerca de 78% dos gases da atmosfera, através da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. A interação entre bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* e plantas leguminosas tem sido extensivamente estudada. Durante essa interação, as bactérias induzem nódulos nas raízes das leguminosas, convertendo o  $N_2$  a  $NH_3$ , através do complexo enzimático da nitrogenase. A planta fornece às bactérias os compostos de carbono (C) e outros nutrientes para sustentar o crescimento bacteriano, enquanto a bactéria fornece N à planta hospedeira.

A associação entre a soja e as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* contribui, significativamente, para o sucesso da cultura no Brasil, uma vez que a demanda de nitrogênio (N) das cultivares brasileiras pode ser suprida totalmente pelo processo biológico. Estudos de quantificação da FBN no país indicam que o processo biológico pode suprir a soja em até 300 kg de N ha<sup>-1</sup>, resultando em uma economia estimada em US\$ 3 bilhões por safra (Hungria et al., 2005).

O conhecimento sobre genes nos rizóbios envolvidos na nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) e no processo de FBN (*nif* e *fix*) são elevados (Stougaard,

2000), entretanto, pouco se sabe sobre os genes das leguminosas hospedeiras que estão relacionados à simbiose. O estudo dos fatores genéticos das plantas relacionados com a FBN é dificultado pelo tamanho e complexidade do genoma (Thoquet, et al., 2002).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem possibilitado a construção de mapas genéticos saturados para várias culturas de interesse econômico. Esses mapas constituem ferramentas importantes para estudos de genética e genômica dessas espécies, revelando novas possibilidades para o estudo da herança quantitativa e aplicação no melhoramento genético destas culturas, como o mapeamento de QTLs, monitoramento da resposta à seleção e identificação de germoplasma com alelos superiores. Com isso, é possível determinar os QTL relacionados com a produção de sementes, o peso de plantas, o tempo de florescimento, a maturidade, a qualidade e a resistência a estresses bióticos e abióticos. O emprego dessa tecnologia no mapeamento e clonagem baseada em mapeamento de genes de plantas leguminosas relacionados com a FBN tem sido relatado (Colebatch et al., 2001; Thoquet et al., 2002). Cregan et al. (1999) e Song, et al. (2004) desenvolveram um mapa genético de ligação do genoma da soja com marcadores microsatélites (SSR – Simple Sequence Repeat) integrado com outros marcadores moleculares e marcadores clássicos. Alguns desses marcadores moleculares disponíveis no mapa do genoma da soja já estão sendo empregados em programas de melhoramento.

Na soja, Nicolás et al. (2005) identificaram, pela utilização de marcadores do tipo microsatélites (SSR), em uma população de 160 famílias  $F_{2,3}$  do cruzamento BRS 133 (baixa capacidade de FBN) X Embrapa 20 (média capacidade de FBN), 16 associações significativas entre marcadores SSR e QTL para parâmetros de crescimento e nodulação das plantas. Sete marcadores foram confirmados em outra população composta por 157 linhagens  $F_{2,7}$  do cruzamento das cultivares Bossier (alta) e Embrapa 20 (média) (Santos et al., 2005).

Atualmente, busca-se identificar novos marcadores SSR que sejam polimórficos para essas duas populações, visando uma maior saturação das regiões onde foram detectados os QTL para crescimento e nodulação.

## Objetivos

Verificar a existência de polimorfismo dos marcadores SSR entre os parentais Bossier e Embrapa 20 e avaliar a segregação dos marcadores polimórficos na população.

## Material e Métodos e Resultados

As análises estão sendo conduzidas em uma população de mapeamento composta por 157 linhagens endogâmicas recombinantes derivadas do cruzamento de duas cultivares previamente identificadas como tendo distintas capacidades de FBN, Bossier (alta) X Embrapa 20 (média) (Nicolás et al., 2002).

As amostras de DNA foram extraídas a partir de duas a três folhas (primeiras folhas trifoliadas) de cada uma das 157 linhagens  $F_{2.7}$  e dos parentais Bossier e Embrapa 20 pelo método descrito por Keim et al. (1988). A seguir, cada amostra de DNA genômico total é amplificada com "primers" microssatélites escolhidos a partir do mapa do genoma da soja (Cregan et al., 1999). Os fragmentos são separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (29:1, acrilamida:bis-acrilamida) 10%, corados em uma solução de brometo de etídio ( $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e fotografados sob luz UV. A partir do perfil das bandas nos géis, é construída uma matriz de dados numéricos para cada marcador, considerando-se 1 (presença de banda da parental Bossier) e 2 (presença da banda da parental Embrapa 20).

Os cálculos da frequência de recombinação, da distância genética entre os diferentes marcadores genéticos e da determinação do posicionamento dos marcadores estão sendo feitos como auxílio do programa MAPMAKER/EXP. O agrupamento dos marcadores está sendo feito adotando um valor limite de detecção (LOD) de 3,0 e a conversão da frequência de recombinação para centimorgans (cM) com a distância de mapeamento de Haldane ( $r = 0,50$ ).

Na Figura 1, pode-se verificar os resultados obtidos com a amplificação de um dos "primers" do tipo microssatélite.

## Considerações Finais

Quarenta e dois marcadores apresentaram-se polimórficos para os parentais Bossier e Embrapa 20 e estão sendo amplificados na população. Até o presente momento, sete marcadores foram amplificados na população.

## Agradecimentos

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

## Referências

- COLEBATCH, G.; TREVASKIS, B.; UDVARDI, M. Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. **New Phytologist**, v.153, p.37-42, 2002.
- CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; Madison, v. 39, p. 1464-1490, 1999.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).
- KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 15, p. 150-152, 1988.
- NICOLÁS, M.F.; ARIAS, C.A.A.; HUNGRIA, M. Genetics of nodulation and nitrogen fixation in Brazilian soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, p. 109-117, 2002.
- NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C.A.A. Identification of quantitative



trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, 2005. (no prelo).

SANTOS, M. A.; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e a soja [*Glycine max* (L) Merr.]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 2005 (corrigido e retornado ao editor).

SONG, Q. J.; MAREK, L.K.; SHOEMAKER, R. C.; LARK, K. G.; CONCIBIDO, V.C.; DELANNAY, X.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.122-128, 2004.

STOUGAARD, J. Regulators and regulation of legumes root nodule development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124: p. 531-540, 2000.

THOQUET, P.; CHÉRARDI, M. JOUNET, E-P.; KERESCT, A., ANÉ, J-M.; PROSPERI, J-M.; HUGUEST, T. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume e genomics and the isolation of agronomically important genes. **BioMed Central Plant Biology**, v. 2, 13p., 2002.

# Análise filogenética de rizóbios, utilizados em inoculantes comerciais brasileiros, com base no seqüenciamento do gene ribossomal 16S

---

Pâmela Menna<sup>1</sup>; Fernando Gomes Barcellos<sup>2</sup>; Jesiane Stefânia da Silva Batista<sup>3</sup>; Eliane Bangel<sup>4</sup>; Rubens José Campo<sup>5</sup>; Mariangela Hungria<sup>5</sup>. <sup>1</sup>Bolsista de mestrado da CAPES; <sup>2</sup>Bolsista de pós-doutorado do CNPq; <sup>3</sup>Bolsista de mestrado da Embrapa; <sup>4</sup>FEPAGRO; <sup>5</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

Rizóbios são bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) e convertê-lo a uma forma assimilável pelas plantas, quando em simbiose com determinadas plantas da família Leguminosae (Hungria, 1994). Esse processo, conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN), permite suplementar ecossistemas naturais com novas quantidades de nitrogênio (N), aproveitando a reserva inesgotável de N<sub>2</sub> presente na atmosfera (Drozdowicz, 1997). Contudo, apesar da importância ecológica e econômica, os rizóbios têm sido relativamente pouco estudados. Com base nos dados de seqüenciamento do gene ribossomal 16S, existem atualmente cinco gêneros de rizóbios descritos, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, e mais de 40 espécies compreendidas na subclasse alfa das proteobactérias (Garrity & Holt, 2001). Recentemente, o estudo da diversidade de rizóbios resultou na identificação de novas espécies simbióticas, como no caso de bactérias do gênero *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), pertencente à subclasse beta das proteobactérias, e *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), também na subclasse alfa. Como em muitas outras bactérias, as análises de diversidade, filogenia e taxonomia dos rizóbios têm sido derivadas, principalmente, de seqüências nucleotídicas do gene 16S rRNA. O uso desse gene se deve à constatação de que ele é suficientemente conservado, o que permite o estabelecimento de relações evolucionárias universais, entretanto, com variabilidade suficiente para permitir a classificação bacteriana (Wang & Martinez-Romero, 2000).

No Brasil, diferentes instituições de pesquisa são depositárias de coleções de culturas de rizóbios, provenientes de distintas leguminosas, sendo que a “Coleção de Culturas SEMIA” do Centro de Pesquisa de Fixação Biológica do Nitrogênio, da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO), é a responsável pela manutenção e distribuição de estirpes recomendadas para o uso em inoculantes comerciais. Algumas dessas leguminosas são de grande importância econômica nacional ou regional, como a soja, o feijoeiro, a ervilha, o feijão-de-corda, o amendoim, a alfafa, os trevos e diversas leguminosas arbóreas utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e para reflorestamento. Embora a coleção de cultura ‘SEMIA’ seja um reservatório de estirpes de rizóbios, resultantes de programas de seleção durante décadas, muito pouco se conhece sobre a diversidade e relações genéticas existentes entre as mesmas e suas respectivas plantas hospedeiras, em regiões tropicais.

## Objetivos

Determinar as relações filogenéticas e, assim, inferir as posições taxonômicas, com base no seqüenciamento do gene ribossomal 16S, de 68 estirpes SEMIA recomendadas como inoculantes para 64 leguminosas de importância econômica e/ou ambiental para o Brasil.

## Material e Métodos

- Estirpes utilizadas

Foram analisadas 68 estirpes provenientes da FEPAGRO, denominadas SEMIA (Secção de Microbiologia Agrícola), isoladas de 46 distintas leguminosas e recomendadas, como inoculantes, para 64 leguminosas.

Extração do DNA e amplificação por PCR da região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA e purificação dos produtos obtidos

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Fernandes et al. (2003). O DNA obtido foi diluído a 20 ng de DNA  $\mu\text{L}^{-1}$  e, a seguir, mantido

a -20°C. O DNA de cada estirpe foi amplificado com "primers" para a região do gene ribossomal 16S, conforme descrito por Weisburg *et al.* (1991). Os produtos de PCR obtidos foram, posteriormente, precipitados utilizando o protocolo de precipitação por acetato de amônio (7,5M) e etanol. Após a precipitação, a concentração do DNA de cada amostra foi verificada em gel de agarose a 1.5%, ajustada para 40 ng DNA  $\mu\text{L}^{-1}$  e mantida a -20°C.

#### - Seqüenciamento e análise do gene 16S rRNA

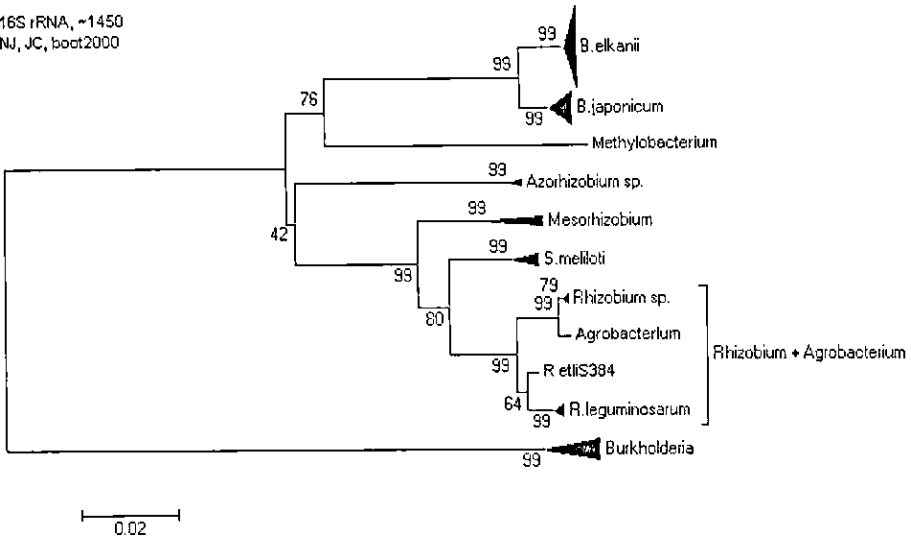
Os produtos de PCR obtidos de cada estirpe (80 ng por reação) receberam uma mistura de 3  $\mu\text{L}$  de dye (DYEnamic ET terminator reagente para o MegaBACE, Amersham Biosciences), e 3 pmol de cada "primer". Para que a seqüência completa do gene 16S rRNA fosse obtida, foram realizadas cinco reações com os seguintes primers fd1, Y2, (Fernandes *et al.*, 2003) e 362f, 786f e 1203f (Prof. Leonardo M. Cruz, Dept. de Bioquímica, UFPR, Curitiba, PR, Brasil). Após amplificação, cada 20  $\mu\text{L}$  de reação foram precipitados utilizando o protocolo de precipitação com acetato de amônio (7,5M) e etanol e, então, procedeu-se ao seqüenciamento (MegaBACE 1000 DNA). As seqüências obtidas foram reunidas em "contigs" usando os programas phred, phrap e consed e depositadas no Banco de dados (GeneBank), onde receberam um número de acesso de AY904726 a AY904789. Posteriormente, uma árvore filogenética foi construída, utilizando uma análise de "bootstrap" de 2.000 repetições e o coeficiente de Neighbour Joining (NJ).

## Resultados

O dendrograma resultante, após a análise das seqüências do 16S RNAr, revelou heterogeneidade e dividiu as estirpes em nove grupos principais, reunidos em um nível de similaridade de 77,8%. Sete destes grupos foram relatados aos gêneros/espécies de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Rhizobium tropici*/Agrobacterium (reclassificado como *Rhizobium*), *R. leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*/S. *fredii*, *Mesorhizobium ciceri*/M. *loti*, e *Azorhizobium caulinodans* (Fig. 1).

Foi possível observar alguns agrupamentos distintos, com estirpes apre-

16S rRNA, ~1450  
NJ, JC, boot2000



**Figura 1.** Árvore filogenética, baseada no seqüenciamento de gene 16S rRNA, de 68 estirpes simbiotes de 46 leguminosas e oficialmente recomendadas para o uso em inoculantes comerciais brasileiros, bem como de estirpes-tipo e estirpes utilizadas como referência das espécies de rizóbios. Análise considerando o algoritmo Neighbour Joining e os números indicam os resultados obtidos na análise por "bootstrap" com 2000 repetições.

sentando discrepância em mais de 15 nucleotídeos das estirpes-tipo, sugerindo que essas podem estar relacionadas a novas espécies e, desse modo, foram classificadas como "sp.".

Os resultados demonstraram uma elevada promiscuidade quanto à planta hospedeira, com estirpes estabelecendo simbiose com leguminosas pertencentes a distintas tribos e até mesmo distintas subfamílias. Desse modo, os resultados demonstraram não haver correlação evolucionária entre as estirpes analisadas e suas respectivas plantas hospedeiras, em regiões tropicais.

## Considerações Finais

A comparação de seqüências do gene ribossomal 16S demonstrou ser

uma ferramenta poderosa para deduzir relações filogenéticas e evolucionárias, além de definir posições taxonômicas entre bactérias capazes de fixar  $N_2$  em simbiose com leguminosas. O grau elevado de diversidade genética observado entre as estirpes demonstra que as regiões tropicais são importantes reservatórios de genes de fixação de nitrogênio, os quais ainda necessitam ser explorados.

## Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq (471773/2004-2, 301241/2004-0) e pelo PRONEX. Os autores agradecem a Ligia Maria O. Chueire pelo apoio na condução das análises.

## Referências

- DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., (Ed.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 17-67.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 911-920, 2003.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology** 2<sup>nd</sup> ed. New York., Springer-Verlag, 2001. v.1, p.119-154.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p. 339-364, 1994.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, p. 948-950, 2001.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE

LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 214-220, 2001.

WANG, E.T.; MARTINEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Madison: Horizon Scientific Press, p. 177-186, 2000.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

# Parâmetros microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em sistemas de manejo e rotação de culturas

---

Rosinei Aparecida de Souza<sup>1</sup>; Leticia Carlos Babujia<sup>2</sup>; Thaís Portantiolo Correa<sup>2</sup>; Eleno Torres<sup>3</sup>; Julio Cezar Franchini<sup>3</sup>; Mariangela Hungria<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Mestranda em Química Ambiental da UEL; <sup>2</sup>Estudante de graduação do Curso de Química da UEL; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

## Introdução

Alguns experimentos têm indicado que o plantio direto (PD), associado à rotação de culturas, pode incrementar a biomassa microbiana (BM) qualitativa e quantitativamente. Além disso, outras populações de microrganismos relevantes para a agricultura, como os rizóbios fixadores de N<sub>2</sub> e fungos micorrizicos, podem ser beneficiadas. Um dos principais efeitos resultantes do incremento na BM é o do aumento temporário nas imobilizações de N e outros nutrientes que serão, posteriormente, liberados lentamente, de acordo com as necessidades das culturas (Balota et al., 1998, 2003; Hungria, 2000).

Tem sido sugerido que mudanças quantitativas e qualitativas na população de microrganismos do solo podem refletir em mudanças na qualidade do solo sendo, portanto, potencialmente adequadas como indicadores do efeito do manejo do solo e das culturas. Entretanto, existe deficiência de informações consistentes, especialmente para os trópicos, a respeito dos efeitos, a longo prazo, da adição de diferentes resíduos culturais e do uso de sistemas de manejo do solo, sobre a atividade microbiológica. Informações sobre o efeito do manejo do solo e da cultura na microbiota do solo precisam ser obtidas, pois representam a base da sustentabilidade agrícola.



## Objetivos

Avaliar o potencial de uso de parâmetros microbiológicos para monitorar mudanças do solo em resposta aos sistemas de manejo do solo e de rotação de culturas.

## Material e Métodos

O ensaio de campo foi estabelecido em 1997, na estação experimental da Embrapa Soja, em Londrina. O experimento foi desenhado para comparar os efeitos dos sistemas de plantio direto (PD) e convencional (PC) e rotação de culturas, incluindo culturas de grãos (soja, milho e trigo) e culturas de cobertura (tremoço e aveia preta). Os sistemas de rotação são apresentados na Tabela 1. O ensaio foi delineado em blocos ao acaso, com quatro repetições.

**Tabela 1.** Sistemas de manejo adotados para o ensaio.

Rotações	Inverno 97	Verão 97/98	Inverno 98	Verão 98/99	Inverno 99
1	Aveia	Milho	Aveia	Soja	Trigo
2	Aveia	Soja	Tremoço	Milho	Aveia
3	Aveia	Soja	Trigo	Soja	Tremoço

Continua...

...Continuação Tabela 1

Rotações	Verão 99/00	Inverno 00	Verão 00/01	Inverno 01	Verão 01/02
1	Soja	Tremoço	Milho	Aveia	Soja
2	Soja	Trigo	Soja	Tremoço	Milho
3	Milho	Aveia	Milho	Trigo	Milho

As taxas de emissão de CO<sub>2</sub> do solo foram determinadas em treze períodos, seis antes e sete depois da aração do solo, durante o período de agosto a novembro. O CO<sub>2</sub> foi avaliado nos tratamentos que estavam sob as culturas de aveia e trigo com o uso de câmaras estáticas (tubos de PVC, 10 x 20 cm, diâmetro x comprimento), pelo método da armadilha alcalina, modi-

ficado de Anderson (1982) e os valores foram expressos em g de  $\text{CO}_2\text{-C m}^{-2}$   $\text{dia}^{-1}$ . O carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM) foram determinados antes e após o preparo do solo no PC. Cinco subamostras foram coletadas na camada de 0-10 cm, homogeneizadas e combinadas como uma amostra por parcela. A biomassa microbiana do solo foi avaliada pelo método da fumigação-extração, com valores de 0,33 e 0,54 para o quociente de extração de C e N, respectivamente (Brookes et al., 1985; Vance et al., 1987). Os teores de C e N nos extratos foram determinados por espectrofotometria, segundo Bartlett & Ross (1988) e (Feije & Anger, 1972), respectivamente. Os valores obtidos para a BM foram corrigidos para a densidade do solo e expressos em  $\text{g m}^{-2}$ .

O quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi estimado através da razão entre a emissão de  $\text{CO}_2$  e CBM obtidos antes e após a aração, sendo expresso como  $\text{mg of CO}_2\text{-C g}^{-1}$  de CBM  $\text{dia}^{-1}$ . As análises estatísticas foram realizadas para cada tempo de amostragem e combinando as amostras antes e após a aração do solo no PC.

## Resultados

As taxas de emissão de  $\text{CO}_2$  foram afetadas pelas variações no período de amostragem, bem como pelo cultivo e sistemas de rotação de culturas. Antes da aração do solo no PC, as emissões de  $\text{CO}_2$  foram similares nos sistemas de manejo, entretanto, após a sexta amostragem, a aração aumentou as perdas de  $\text{CO}_2$  no PC em 57%, quando comparado com o PD. Considerando todas as amostragens, as emissões foram 21% maiores no PC (dados não mostrados).

Em relação à rotação de culturas, a emissão média total de  $\text{CO}_2$  foi 13% maior na área previamente cultivada com tremoço do que naquela com trigo. Diferenças entre as culturas foram associadas com a decomposição dos resíduos de tremoço entre a terceira e a sexta amostragens após o corte, com valores similares entre os resíduos após essa coleta, indicando uma rápida taxa de decomposição dos resíduos da leguminosa. Deste modo, após a sexta coleta as taxas de emissão de  $\text{CO}_2$  foram 31% menores do que as observadas previamente (dados não mostrados).

A BM foi influenciada pelo momento de amostragem e pelo sistema de manejo, mas não pelos sistemas de rotação de culturas (Tabela 2). Após cinco anos, o CMB e o NMB foram 80% e 104% maiores no PD do que no PC, respectivamente. As diferenças entre amostragens foram observadas apenas no CMB no PD e foram associadas com a cultura do tremoço. A menor BM no PC foi associada com maior emissão de  $\text{CO}_2$ , implicando em pouca conversão do C dos resíduos em BM. É também notável que as diferenças entre o PD e PC, em relação à BM, tenham ocorrido num período de tempo relativamente curto, de cinco anos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Carbono e nitrogênio microbiano nos períodos de pré-aração e pós-aração, em sistemas de manejo do solo e rotação de culturas.

	C-microbiano ( $\text{g m}^{-2}$ )			N-microbiano ( $\text{g m}^{-2}$ )		
	Média	Pré-aração	Pós-aração	Média	Pré-aração	Pós-aração
..... Tratamentos .....						
C1	34,74b	35,02b	34,46b	4,76b	5,21b	4,32b
C2	32,06b	29,73b	34,39b	4,16b	4,71b	3,61b
C3	28,60b	25,96b	31,25b	4,90b	5,33b	4,48b
D1	55,11a	51,89a	58,33a	10,09a	10,98a	9,19a
D2	62,08a	56,96a	67,20a	¥ 9,53a	9,47a	9,58a
D3	54,59a	50,96a	58,21a	8,65a	9,29a	8,01a
..... Sistemas de Manejo .....						
C	31,80 £	30,24 £	33,37 £	4,61 £	5,08 £	4,14 £
D	57,26	53,27	61,25	¥ 9,42	9,92	8,93

C: PC; D: PD; 1, 2 e 3 se referem a aveia, tremoço e trigo, respectivamente, conforme seqüência de culturas dos sistemas de rotação descritos na Tabela 1. Letras indicam diferenças entre sistemas de manejo com a mesma cultura. £ indica diferença entre médias de sistemas de manejo. ¥ indica diferença entre épocas de amostragem

A eficiência da comunidade microbiana foi maior no solo sob PD; em média, o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi 55% menor do que no PC. O  $q\text{CO}_2$  foi maior antes da aração do solo no CT e, após essa etapa, pareceu estar relacionado com a decomposição dos resíduos, embora nenhuma relação tenha sido observada com as culturas (dados não mostrados).

## Considerações Finais

Os maiores valores encontrados de CBM e NBM e as menores taxas de emissão de CO<sub>2</sub> e menores quocientes metabólicos ( $q\text{CO}_2$ ) encontrados no PD, em comparação ao PC, enfatizam a importância do PD para a conservação da matéria orgânica do solo. Os parâmetros microbiológicos avaliados neste estudo responderam com rapidez e sensibilidade aos efeitos do manejo do solo, demonstrando serem adequados como indicadores da qualidade do solo.

## Agradecimentos

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

## Referências Bibliográficas

ANDERSON, J.P.E. Soil respiration. In: PAGE, A.L., MILLER, R.H., KEENEY, D.R., (Eds.). **Agronomy monograph** number 9, Part II, Chemical and biological properties, 2<sup>nd</sup> Edition. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1982. pp. 831-871.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, p. 15-20, 2003.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. 1998. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 22, p. 641-649, 1998.

BARTLETT, R.J.; ROSS, D.N., Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, Wisconsin, v. 52, p. 1191-1192, 1998.

BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S., Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct

extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.17, p.837-842, 1985.

FEIJE, F.; ANGER, V., 1972. Spot test in inorganic analysis. **Analytical Chemistry Acta**, v. 149, p. 363-367, 1972.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: MEMORIAS DE LA REUNIÓN BIENAL DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., 1999, Florianópolis, SC, Brazil. **Anais...** EPAGRI, Florianópolis, 2000. pp. 1-15 (CD Rom).

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

## Identificação de um isolado de carlavirus em *Arachis pintoi* Krap & Greg.

Tatiana Mituti<sup>1</sup>; Daniele Cortezi<sup>1</sup>; Camila L. Nunes<sup>1</sup>; Elliot W. Kitajima<sup>2</sup>; Priscila Belintani<sup>3</sup>; José O. Gaspar<sup>3</sup>; Álvaro Manoel Rodrigues Almeida<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Graduanda da UNIFIL; <sup>2</sup>ESALQ; <sup>3</sup>IBILCE/UNESP; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

*Arachis repens* Handro, planta da família Fabaceae ([http://scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail\\_list?this\\_id=4062504At](http://scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.detail_list?this_id=4062504At)) tem sido utilizada em jardinagem como cobertura de solo. A planta é cultivada como forração à maneira de gramado, apresentando folhagem sempre verde que lhe confere notável efeito decorativo.

Algumas plantas de jardins localizados na área urbana de Londrina, PR e em áreas rurais, protegendo curvas de nível, apresentavam folhas reduzidas e com sintomas de mosaico (Fig. 1A). Esses sintomas sugeriam a presença de vírus.

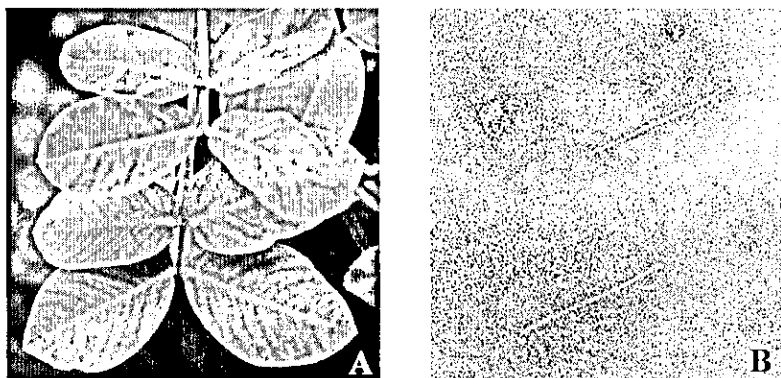


Figura 1. (A) Sintomas de mosaico observados em plantas de *Arachis repens* Handro naturalmente infectadas. (B) Fotomicrografia de partícula do vírus identificado em plantas de *Arachis repens* Handro, com sintomas de mosaico.

Como essas plantas também aparecem próximas a campos de soja, procurou-se identificar a possível ocorrência de vírus em *Arachis repens* através de ensaios de estudos de gama de hospedeiras, transmissão mecânica, microscopia eletrônica, purificação e sorologia.

## Material e Métodos

**Coleta de plantas e multiplicação.** Hastes de plantas com sintomas de mosaico foram retiradas das plantas e transplantadas para solo estéril. Após cerca de 30-45 dias, folhas com sintomas foram utilizadas como fonte de inóculo para estudos de hospedeiras diferenciais.

**Microscopia eletrônica.** Amostras de folhas com sintomas de mosaico foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão ("leaf dip") segundo Kitajima & Nome (1999)

**Gama de hospedeiras.** Plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* (variedades Jalo, Manteiga, IAPAR 144, Carnaval, Rosinha e Tibagi) e *Glycine max* cv. CD 206 foram inoculadas com suspensão viral obtida a partir da maceração de tecido foliar sintomático, na presença de tampão fosfato de potássio 0,01M, pH7, utilizando carvão vegetal finamente moído como abrasivo. Após a inoculação, as plantas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação. As avaliações foram feitas aos 14 e 21 dias após a inoculação.

**Purificação.** Folhas de plantas infectadas foram coletadas e moídas em tampão fosfato de potássio 0.5 M, pH 7.0, contendo 0,005M EDTA e sulfito de sódio 0,1%, na proporção 1:2 (g/v) segundo Gaspar & Costa (1993). O macerado foi filtrado em gaze e, em seguida, clarificado com ½ volume da mistura de clorofórmio e tetracloreto de carbono (1:1), sob agitação por 30 min. Após a clarificação, o material foi submetido à centrifugação de 10.950 g por 15 min. O sobrenadante foi coletado, adicionando Triton X-100 0.5% e PEG 8000 6% e mantendo sob agitação constante por duas horas a 4°C. Após esse período, o material foi centrifugado por 15 min a 10.950 g e o precipitado ressuspendido em 10% do volume inicial (tampão fosfato de potássio 0,5M, 0,02M EDTA, Triton X-100 0,1% e DTT 1M

0,1%) e ficando sob agitação por aproximadamente 12 horas. O material foi novamente submetido à centrifugação por 15 minutos (10.950 g). O sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado a 110.000 g por 90 min. A preparação semipurificada do vírus foi submetida a gradiente de sulfato de céσιο (50%-10%), o qual foi ultracentrifugado a 110.000 g por duas horas. A banda resultante foi recolhida e submetida a uma nova ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores.

**Eletroforese de proteína capsidial.** A massa molecular da proteína capsidial foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS, descrito por Laemmli, 1970. A análise foi realizada à temperatura ambiente, com utilização do tampão Tris-Glicina pH8.3, a 120v, durante uma hora. Após a eletroforese, o gel foi retirado da placa e corado com Comassie Blue R 250. O cálculo da massa molecular da proteína capsidial foi determinado pela regressão linear obtida com a distância migrada pelos padrões de proteínas utilizadas e as respectivas massas moleculares.

**ELISA indireto.** O teste de ELISA indireto (Koenig, 1981) foi feito utilizando anti-soro obtido pela imunização de coelhos com preparações purificadas do *Cowpea mild mottle virus* (CMMV), um membro do gênero carlavirus. A imunoglobulina G (IgG) foi obtida após purificação do anti-soro. Utilizaram-se duas diluições da IgG (1:500 e 1:1000). O extrato vegetal foi utilizado nas diluições de 1:300, 1:500 e 1:1200. Duas outras espécies vegetais, infectadas pelo CMMV foram utilizadas além de *A. repens*. A amostra de folhas de feijão 'Jalo' sadio foi utilizada como controle negativo.

## Resultados e Discussão

A análise de microscopia eletrônica demonstrou a presença de partículas alongadas, com cerca de 650 nm, típicas de vírus do grupo carlavirus (Fig. 1B). Os sintomas induzidos em diferentes plantas hospedeiras e a reação de plantas infectadas demonstraram que o vírus possui estreita gama de hospedeiras.



Sintomas de clorose nas plantas de feijão inoculadas apareceram cerca de 16 dias após a inoculação, e todas as variedades inoculadas apresentaram resposta positiva à infecção do vírus, comprovando a ocorrência de um agente infeccioso.

Eletroforese feita a partir de suspensão purificada do vírus mostrou banda com massa molecular de 33 kDa, similar àquela observada com o CMMV (Fig. 2).

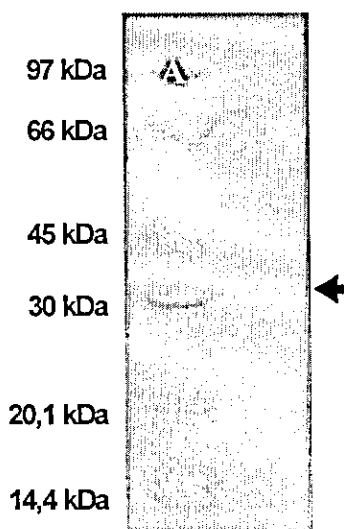
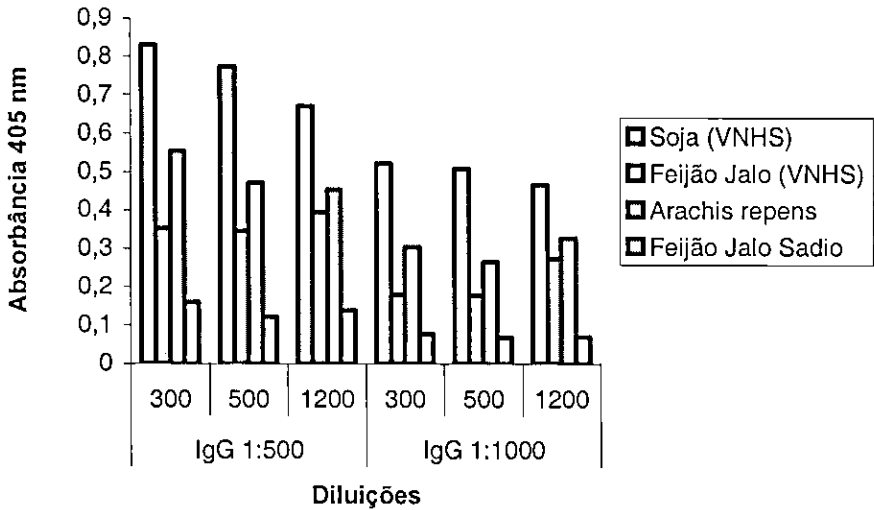


Figura 2. Eletroforese de proteína capsidial do vírus isolado de *Arachis repens* Handro.

Os resultados obtidos por ELISA indireto demonstram que o anti-soro reagiu com todas as amostras infectadas, incluindo a amostra de *A. repens*, o que demonstra ser o vírus estudado, o CMMV. Todas as diluições utilizadas de IgG e de antígeno (extrato foliar infectado) apresentaram resultados positivos (Fig. 3).

O vírus isolado de *A. repens* infectou apenas plantas da família Fabaceae. *Arachis repens* é normalmente multiplicado por estaca, o que deve colaborar para sua disseminação. Embora não tenha sido testado, acredita-se que sua disseminação seja através de mosca branca, similar à transmissão do CMMV.



**Figura 3.** Absorbância observada entre amostras infectadas e sadias por ELISA indireto, utilizando IgG purificada contra o *Cowpea mild mottle vírus*. Amostras diluídas em 1:300, 1:500 e 1:1200.

## Referências

- GASPAR, J.O.; COSTA, A.S. **Vírus do mosaico angular do feijoeiro: purificação e ultraestrutura dos tecidos infectados**, 1993. 534-540 p. (Fitopatologia brasileira, 18).
- KITAJIMA, E.W.; NOME, C. F. Microscopia electronica em virologia vegetal. In Docampo, D.M. & Lenardón, S.L. eds. **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba, IFFIVE/INTA-JICA, 1999. 59-87 p.
- KOENIG, R. **Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses**, 1981. 53-62 p. (Journal of Geneneral Virology, 55).
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**, 1970. 680-685 p. (Nature 227).

## **Distribuição de carbono e estabilidade de agregados em amostras indeformadas de diferentes sistemas de manejo de solo**

---

Thais P. Correa<sup>1</sup>; Letícia C. Babujia<sup>1</sup>; Rosinei A. Souza<sup>2</sup>; Eleno Torres<sup>3</sup>; Júlio Cezar Franchini<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Estudante de graduação da UEL; <sup>2</sup>Mestranda da UEL; <sup>3</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

A matéria orgânica do solo (MOS) é a principal responsável pela formação e estabilidade de agregados, que por sua vez, determinam maior resistência do solo à erosão e uma estrutura mais adequada para o estabelecimento e desenvolvimento das culturas. O manejo inadequado, com excessivo revolvimento, pode causar uma rápida deterioração da estrutura devido a desorganização do ambiente do solo e o conseqüente aumento na oxidação da MOS. A agregação do solo e a dinâmica de formação de agregados são importantes em vários aspectos, proteção da física da MOS, fornecimento adequado de água e oxigênio para as raízes, fornecimento de microhabitats para a macro e microfauna do solo e formação de poros de maior diâmetro que favorecem a infiltração de água reduzindo o escoamento superficial e a erosão. A adoção de sistemas de manejo com menor revolvimento do solo tem sido indicada para a recuperação dos teores de MOS e da estabilidade estrutural de solos degradados pelo uso do plantio convencional (Castro Filho et al., 2002; Madari et al., 2005). Neste contexto este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de sistemas de manejo com diferentes taxas de revolvimento do solo sobre a dinâmica de agregação e distribuição de carbono em agregados.

### **Material e Métodos**

A dinâmica de agregação foi avaliada em experimento de longa duração estabelecido na fazenda experimental da Embrapa Soja, em Londrina,

PR. Foram amostrados os tratamentos sob plantio direto contínuo (PD), plantio direto com escarificação com arado cruzador a cada três anos (PDc), plantio convencional contínuo (PC) e a conversão do plantio convencional para o plantio direto (PDn). Os três primeiros sistemas foram estabelecidos em 1989, enquanto o último em 2001, apresentando portanto 16 e 3 anos, respectivamente, no momento da avaliação. Os sistemas foram sempre cultivados com a sucessão soja/trigo. Em outubro de 2004, foram coletadas amostras indeformadas de solo na camada de 0-10 cm. As amostras foram coletadas em recipientes plásticos com dimensões de 11 cm x 11 cm x 10 cm (largura, comprimento e altura, respectivamente). Os blocos foram saturados durante 20 minutos e transferidos para a peneira superior de um conjunto constituído por peneiras com abertura de malha decrescente, 8,00; 4,00; 2,00; 1,00 e 0,50 mm. As peneiras estavam contidas em um recipiente com água e foram submetidas à oscilação vertical de 5 cm numa taxa de 30 ciclos por minutos, durante 30 minutos. A seguir, o solo retido em cada peneira foi separado. A fração < 0,50 mm foi passada por peneira de malha de 0,053 mm e a suspensão resultante foi floculada com  $\text{CaCl}_2$ . Todas as frações foram pesadas, secadas, moídas e analisadas quanto ao seu teor de carbono (C) por oxidação com dicromato em meio ácido. A massa dos agregados foi utilizada para o cálculo do diâmetro médio geométrico (DMG) segundo Schaller & Stockinger (1953).

## Resultados e Discussão

A estabilidade de agregados foi alterada pelos sistemas de manejo do solo (Figura 1). De modo geral, nas classes > 2,00 os sistemas de plantio direto apresentaram maior proporção de agregados, enquanto nas classes < 2,00 a maior proporção de agregados ocorreu no plantio convencional. Deste modo, o revolvimento do solo proporcionou uma redução do DMG dos agregados, que foi de 1,33; 1,30; 1,18 e 1,06 mm, para os sistemas PD, PDc, PDn e PC, respectivamente. As classes mais afetadas pelos sistemas de manejo foram as de agregados > 8,00 mm e de 0,5-0,053 mm. O teor de C nas classes de agregados foi maior nos sistemas de PD e

PDc em relação aos sistemas PDn e PC (Figura 2). De modo geral, o teor de C foi proporcional ao tamanho das classes, até a classe de 1-0,5 mm, onde foram observados os menores teores. Nas classes seguintes (0,5-0,053 e <0,053) os teores de C tenderam a aumentar em todos os sistemas, e no PC a classe de partículas primárias foi a que apresentou o

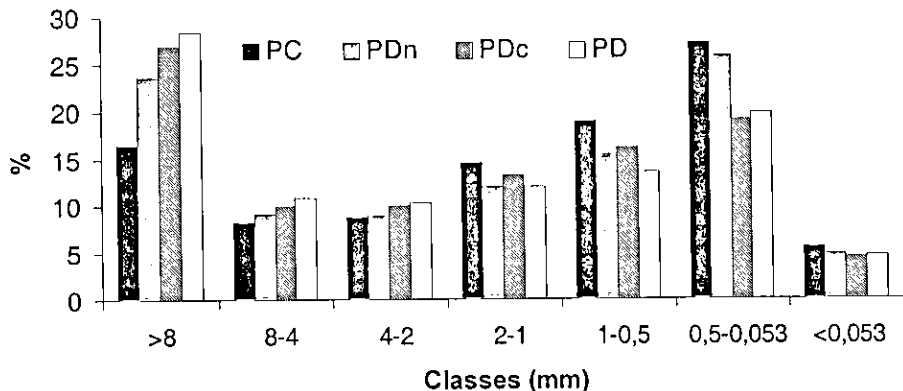


Figura 1. Distribuição das classes de agregados em sistemas de manejo do solo. PC: plantio convencional; PDn: plantio direto 3 anos; PDc: plantio direto/cruzador 3 anos; PD: plantio direto contínuo.

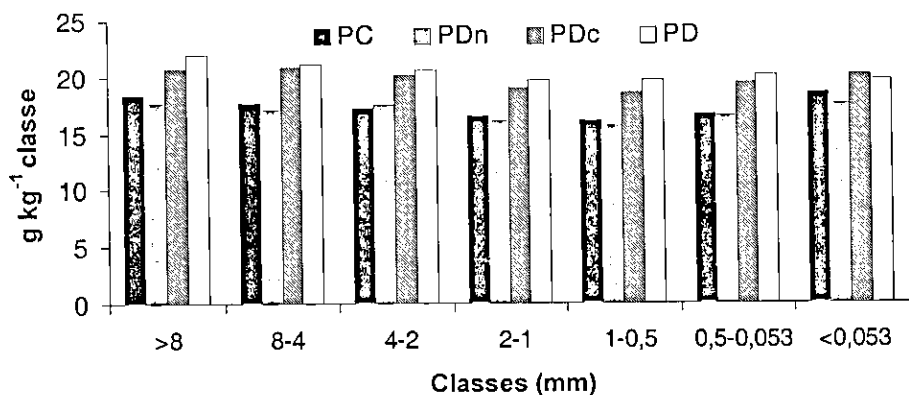


Figura 2. Teor de carbono das classes de agregados em sistemas de manejo do solo. PC: plantio convencional; PDn: plantio direto 3 anos; PDc: plantio direto/cruzador 3 anos; PD: plantio direto contínuo.

maior teor de C. Esse comportamento demonstra que os agregados > 0,5 mm proporcionam melhor proteção ao C, razão pela qual seu acúmulo é aumentado nestas classes. No caso do PC, a menor agregação nas classes maiores diminuiu a proteção do C, o que torna seu teor maior na classe representada pelas partículas primárias (<0,053 mm).

A distribuição do C entre as classes de agregados seguiu a mesma tendência observada para a estabilidade das classes, sendo portanto, maior a quantidade de C nos sistemas de plantio direto nas classes > 2,00 mm, enquanto nas classes < 1,00 mm a quantidade foi maior no PC (Figura 3).

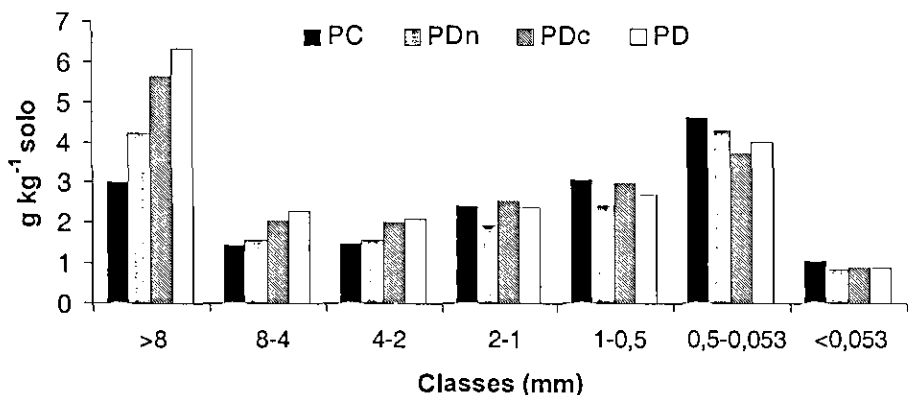


Figura 3. Distribuição de carbono nas classes de agregados em sistemas de manejo do solo. PC: plantio convencional; PDn: plantio direto 3 anos; PDc: plantio direto/cruzador 3 anos; PD: plantio direto contínuo.

O comportamento do sistema PDn demonstra que o plantio direto contribuiu para a recuperação da estabilidade de agregados antes mesmo que ocorressem alterações significativas nos teores de C nos agregados. Esse comportamento pode estar associado com as alterações no ambiente físico e biológico que contribuem para a estabilização dos agregados por mecanismos não afetados diretamente pelo carbono, como a estabilização por hifas de fungos e raízes.

A coleta de blocos indeformados de solo para determinação da estabilidade de agregados permitiu a identificação de duas classes potencialmente

afetadas pelo manejo: > 8,00 e 0,5-0,053 mm. A vantagem deste método é que ele não altera a disposição natural dos agregados no solo como outros métodos que fazem pré seleção de agregados no campo e acabam selecionando agregados de maior diâmetro (Madari et al., 2005). Outra vantagem do método, foi a possibilidade de observar de forma clara a participação do C na estabilização de agregados > 1,00, que por outros métodos tem sido atribuída apenas a agregados > 4,00.

## Conclusão

A estabilidade de agregados é diretamente afetada pela intensidade de revolvimento do solo e tem relação direta com a conservação do C no solo.

## Referências

- CASTRO FILHO, C.; LOURENÇO, A.; GUIMARAES, M.F.; FONSECA, I.C.B.. Aggregate stability under different soil management systems in a red latosol in the State of Parana, Brazil. *Soil Till. Res.*, 2002. 65, 45-51.
- MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A.; TORRES, E.; ANDRADE, A.G.; VALENCIA, L.I.O.. No tillage and crop rotation effects on soil aggregation and organic carbon in a Rhodic Ferralsol from southern Brazil. *Soil Till. Res.*, 2005. 80:185-200.
- SCHALLER, F.W.; STOCKINGER, K.R.. A comparison of five methods for expressing aggregation data. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1953. 17:310-313.

## **Grupos de desenvolvimento humano: uma proposta para a promoção da auto-análise e autogestão na Embrapa Soja**

---

Danieli de Cássia Barreto<sup>1</sup>; Vivian Maria Stabile Fumo<sup>1</sup>; Talita Soares Lopes<sup>1</sup>; Camila Lombardi Padovezi<sup>1</sup>; Rosely Jung Pisicchio<sup>2</sup>; Lucila Gazzola. <sup>1</sup>Estagiárias da Embrapa Soja; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

Conhecer a história do trabalho, identificar as características particulares da organização, as relações de poder nela instituídas e também as formas de expressão que a organização permite aos seus trabalhadores, constituem aspectos indispensáveis para que se possa entender a intrincada relação indivíduo-trabalho-organização.

O conhecimento de tal relação permite que se tenha condições de propor ações que venham favorecer tanto o trabalhador - em seu desenvolvimento pessoal e interpessoal - quanto à organização da qual ele participa.

Conforme as pessoas executam e praticam suas ações, vão se construindo como sujeitos. Nessa construção, o trabalho adquire um dos papéis sociais de maior destaque, pois contribui na produção de sua subjetividade. Segundo Guattari e Rolnik (1993), a subjetividade funciona tecendo modos de ser, que determinam diferentes maneiras de agir, sentir e pensar. Em outras palavras, a subjetividade é a produção de distintos modos de vida, através dos quais os indivíduos vêem, sentem e se relacionam com o mundo.

Uma das formas de se resgatar a subjetividade das pessoas que trabalham nas organizações é através da utilização do referencial teórico da Análise Institucional. Essa tem como proposta criar situações que proporcionem espaços de fala, reflexão e ação (Barembliitt, 2002).

A finalidade da Análise Institucional é a implantação de dois processos simultâneos e articulados: a auto-análise e a autogestão. A auto-análise



implica na produção de um saber, ou seja, do conhecimento do grupo acerca dos seus problemas, necessidades e recursos. Para chegar a esse ponto, é preciso criar dispositivos, ou seja, organizar-se. Quando o grupo alcança esse nível de organização e é capaz de colocar mudanças em prática, pode-se dizer que esse grupo alcançou a autogestão.

É através do trabalho com grupos que se poderão concretizar tais processos. Segundo Osório (2003, p. 57), grupo é definido como “o conjunto de pessoas capazes de se reconhecerem em sua singularidade e que estão exercendo uma ação interativa com objetivos compartilhados”.

Na Embrapa Soja, é através dos grupos de Desenvolvimento Humano (DH) que se busca desenvolver a auto-análise e a autogestão, e assim, resgatar a subjetividade das pessoas que nela atuam.

## **Objetivos**

- Conhecer como as relações de poder/saber acontecem dentro da organização, favorecendo o espaço de fala, com vistas a transformações desejáveis pelos trabalhadores e pela empresa.
- Oportunizar os processos de auto-análise e autogestão dos grupos.
- Favorecer o desenvolvimento das relações interpessoais dentro da empresa.
- Estimular o trabalho em equipe e a circulação de lideranças.
- Transpor para o cotidiano organizacional as experiências construídas nos grupos.

## **Desenvolvimento**

Para a formação e a estruturação dos grupos de Desenvolvimento Humano, existem regras necessárias, quais sejam: frequência, horário, duração, sigilo e local das reuniões. Todas essas regras, exceto sigilo, são discutidas e elaboradas pelo grupo. O grupo passa a decidir sobre seu funcionamento, ou seja, decidem sobre a participação ou não de um novo integrante, os temas a serem trabalhados, etc.

A partir dos temas propostos pelo grupo, os quais devem estar relacionados ao cotidiano organizacional, as coordenadoras atuam como facilitadoras dos processos de auto-análise e autogestão do mesmo. Isso quer dizer, estimulam os integrantes para que se articulem e analisem a situação em que se encontram e, posteriormente, busquem ações concretas e benéficas para o grupo e a empresa como um todo.

Para referenciar o trabalho das estagiárias e, por conseguinte, o trabalho com grupos, são realizadas supervisões semanais de campo e acadêmica, supervisões conjuntas, levantamento e estudos bibliográficos para orientar ações relacionadas aos grupos, e também, elaboração de relatos das reuniões para posterior confecção do relatório acadêmico.

Os grupos de Desenvolvimento Humano da Embrapa Soja tiveram seu início em março de 2004. A psicóloga da unidade e as estagiárias fizeram visitas aos setores para explicação da proposta de intervenção e a formação dos grupos aconteceu de forma voluntária.

Inicialmente, foram formados seis grupos (Tabela 1). O grupo A interrompeu suas atividades em janeiro de 2005. O grupo D, devido à sobrecarga de trabalho, interrompeu temporariamente as reuniões em novembro de 2004, com o compromisso de avaliar sua retomada no ano seguinte. Atualmente, há, na Embrapa Soja, quatro grupos de Desenvolvimento Humano em andamento (B, C, E, F). No mês de junho de 2005, o grupo D se reencontrará e aguarda-se a confirmação de um novo grupo (G).

**Tabela 1.** Número de reuniões de Desenvolvimento Humano e média de participantes, no período de março de 2004 a maio de 2005

Grupo	Nº de reuniões de DH	Média de participantes
A	19	8
B	26	7
C	25	6
D	14	8
E	13	9
F	23	10

## Resultados

O trabalho com os grupos possui resultados eminentemente qualitativos e de difícil mensuração. Tais resultados podem ser observados através da análise e da evolução das ações do grupo e, também, através dos relatos de seus participantes, os quais podem ser exemplificados com as seguintes falas:

“O trabalho em grupo tem uma visão de longo prazo”.

“Aqui é o espaço pra gente conversar, discutir e se conhecer”.

“Queria falar o que eu acho das reuniões (...) Antes eu era muito teimoso e bruto com as pessoas, mas agora estou melhorando, estou me ajustando”.

“Venho sim e estou gostando, porque estou aprendendo a me comunicar com os outros. Antes, tinha poucos amigos; agora meu círculo de amigos aumentou, já estou fazendo mais brincadeiras”.

“Falar o que a gente sente, desabafar, é bom. Não funciona fazer de conta que tudo está bom”.

“... Entender, aprender com os colegas de trabalho. Eu penso de um jeito, eles de outro. Então acho que aqui a gente pode conhecer e melhorar as relações”.

“O relacionamento com os outros já melhorou muito e pode melhorar ainda mais”.

Os principais resultados alcançados nos grupos de Desenvolvimento Humano são: melhoria nas relações interpessoais, auto-conhecimento, ampliação da visão da empresa, divisão de responsabilidades, troca de informações, compartilhamento de experiências, circulação de liderança, exposição de sentimentos e opiniões, e melhoria nos processos de trabalho.

Entende-se que este trabalho alcança seus objetivos e estimula o desenvolvimento humano, uma vez que possibilita o resgate da subjetividade dos trabalhadores, ao valorizar o conhecimento/saber e suas ações.

A continuidade deste trabalho ao longo dos anos é *conditio sine qua non* para o alcance dos objetivos, pois esta é uma das melhores for-

mas de valorizar o maior bem da organização: as pessoas que nela trabalham.

## Bibliografia

BAREMBLITT, G. Compêndio de Análise Institucional e outras correntes: teoria e prática. 5. ed. Belo Horizonte: Instituto Felix Guattari, 2002.

CARVALHO, P. R. de. Análise institucional e extensão universitária: Alguns apontamentos. In: BASTOS, M. N. F. de (org.) Itinerários em psicologia social. Londrina: UEL, 2001.

CHANLAT, J. F. Modos de Gestão, Saúde e Segurança no Trabalho. In: DAVEL, E.; VASCONCELOS, J. (org) "Recursos" humanos e subjetividade. Petrópolis: Vozes, 1996.

GUARESCHI, P. A.; GRISCI, C. L. I. A fala do trabalhador. Petrópolis: Vozes, 1993.

GUATTARI, F.; ROLNIK, S. Micropolítica: Cartografias do Desejo. 3. ed. Petrópolis: 1993.

GUTIERREZ, G. L. Autogestão de empresas: novas experiências e velhos problemas. In: VIEITEZ, C. G. A empresa sem patrão. Marília: Finep, 1997.

HELOANI, J. R. A mudança de Paradigma no pós-fordismo: a nova subjetividade. In: HELOANI, J. R. Organização do trabalho e Administração: uma visão multidisciplinar. São Paulo: Cortez, 1994.

JACQUES, M. G. C. Identidade e Trabalho: uma articulação indispensável. In: CODO, *et al* (org) Trabalho, organizações e cultura. São Paulo: Autores Associados, 1997.

KANAANE, R. Comportamento Humano nas organizações: O Homem Rumo ao século XXI. São Paulo: Atlas, 1999.

OSÓRIO, L. C. Psicologia grupal: uma nova disciplina para o advento de uma era. Porto Alegre: Artmed, 2003.

## Determinação de enzimas de lipoxigenase em soja crua e tratada de cultivares brasileiros

Andreia C. Santana<sup>1</sup>; Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

No Brasil, a soja é utilizada como principal fonte de óleo comestível e como ração animal. Seu grão e sua farinha, no entanto, são muito pouco usados para consumo humano direto, devido ao seu sabor desagradável, classificado como “feijão cru” ou rançoso, considerando-se o potencial nutritivo da soja e a grande produção do grão no país, isto é um contrasenso. Estudos comprovaram que o sabor desagradável da soja está ligado a uma reação que forma compostos à partir de ácidos graxos poliinsaturados, a qual é catalisada pelas enzimas lipoxigenases. As enzimas normalmente são ativadas durante o preparo dos alimentos, quando os grãos de soja são colocados em água fria, e vários compostos são formados os quais apresentam sabores característicos. Na soja existem três lipoxigenases, as isoenzimas: lipoxigenase-1 (L-1), lipoxigenase-2 (L-2) e lipoxigenase-3 (L-3). Por meio de mutação genética, induzida por raios gama, pesquisadores japoneses obtiveram genótipos de soja mutante com a ausência das três isoenzimas (CARRÃO-PANIZZI *et al.* 2000). Na Embrapa Soja, no programa de melhoramento genético para obtenção de cultivares de soja com características mais adequadas ao consumo humano, foram conduzidos cruzamentos para introdução dos genes para ausência de lipoxigenases em cultivares brasileiras. Como resultado, foi obtida a cultivar BRS 213, que não apresenta lipoxigenases e que deverá ser comercializada em 2005. Outras técnicas para melhorar o sabor da soja utilizam metodologias que inativam as enzimas durante o processamento dos alimentos. Por meio do tratamento térmico dos grãos, as enzimas perdem suas funções e o sabor pode ser suavizado. Recomenda-se tratar os grãos em água fervente por cinco minutos, colocando-

os logo após em água fria. Com isso, as lipoxigenases se inativam, pois são desnaturadas com o choque térmico, e perdem suas estruturas.

## **Objetivo**

Determinar a atividade da enzima lipoxigenase em grãos de soja tratados com aquecimento e avaliar a eficácia deste processo para diminuir a atividade das lipoxigenases.

## **Materiais e Métodos**

Uma metodologia simples e rápida para determinar a ausência ou presença dessas enzimas, é o método colorimétrico desenvolvido por KIKUCHI (2001), que utiliza reagentes corantes e pequena quantidade de amostra. Essa metodologia viabiliza a realização de um grande número de análises, facilitando o trabalho de pesquisa e de melhoramento genético. Neste estudo, foram analisadas as cultivares produzidas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Soja, BRS 213, BRS 133 e a BRS 216, quanto a sua reação ao tratamento térmico. Amostras de farinha obtidas de grãos crus (não tratados) e de farinhas obtidas de grãos tratados termicamente, foram analisadas pelo método citado acima, onde observa-se que a cor verde indica a ausência das três isoenzimas; azul indica a ausência das lipoxigenases L-1 e L-2; amarelo indica a ausência de L-3; e incolor indica a presença de todas as enzimas.

## **Resultados e Discussão**

Os resultados dos testes realizados neste experimento mostraram que entre as amostras não tratadas termicamente, somente a cultivar BRS213 não apresentou as enzimas lipoxigenases, enquanto que as cultivares convencionais BRS 133 e BRS 216 apresentaram a presença de todas as lipoxigenases. Quando as amostras foram tratadas termicamente, não foi constatada atividade das enzimas em todas as cultivares, o que mostrou a eficácia do processamento térmico. Como a BRS 213 é resultado de

cruzamentos que visaram à retirada das lipoxigenases nos grãos para obtenção de produtos com sabor superior, era esperado que, no teste, ela apresentasse coloração verde (indicativo de ausência de L-1, L-2. e L-3). Esta cultivar, portanto, dispensa tratamento térmico, implicando em obtenção de produtos alimentares de soja com melhor qualidade.

## **Referências**

- KIKUCHI, A. Simple and Rapid Method for the Detection of Lipoxigenase Isozymes in Soybean Seeds. **Anual Report 2001** n.8, p.47-48, 2001
- CARRÃO-PANIZZI, M.C. Melhoramento Genético da Soja para Obtenção de Cultivares Mais Adequados Para o Consumo Humano **Revista Brasileira de Nutrição Clínica** v.15, n.2, p.330-340, 2000

## **Avaliação do teor de inibidor de tripsina de kunitz e de isoflavonas em grãos de soja germinados da cultivar BRS 213**

---

Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; Andreia C. Santana<sup>1</sup>; José Marcos Gontijo Mandarino<sup>2</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

A produção de soja no Brasil está voltada para a exportação de grãos, farelo protéico e óleo comestível, bem como para a alimentação animal e o para consumo humano. Para a produção de rações para suínos e aves é utilizado o farelo de soja, rico em proteínas, nutriente necessário para o desenvolvimento destes animais (MORAIS & SILVA, 2000). Entretanto, os grãos de soja possuem em sua composição fatores anti-nutricionais que podem prejudicar o desenvolvimento de humanos e animais. São fatores anti-nutricionais: os inibidores de protease (inibidor de tripsina de Kunitz - KSTI) e as lectinas (MORAIS & SILVA, 2000). No organismo humano e animal, o inibidor de tripsina liga-se à enzima tripsina, responsável pela digestão de proteínas, impedindo assim que as proteínas provenientes da dieta sejam absorvidas e aproveitadas, com conseqüente redução no crescimento e desenvolvimento de humanos e animais (RACKIS, 1981). Os inibidores de protease são termolábeis sendo, portanto, parcialmente destruídos pelo processamento térmico como a torra ou cozimento dos grãos (NELSON *et al.* 1979). Entretanto, pesquisas recentes têm demonstrado que estes compostos possuem uma potente ação antioxidante, complexando radicais livres que podem causar danos ao material genético. Os inibidores de protease podem atuar na redução dos riscos de alguns tipos de câncer, bem como no aumento da imunocompetência do organismo (MESSINA *et al.* 1994).

As isoflavonas são outras substâncias presentes na soja, responsáveis pelo sabor adstringente, são compostos fenólicos que possuem estrutura



química semelhante à do hormônio estrógeno sendo, portanto, eficazes no alívio dos sintomas do climatério (menopausa) e na redução dos riscos de câncer hormônio dependentes, como os cânceres de mama, colo de útero e próstata. Reduzem os níveis de colesterol sanguíneo total e do LDL colesterol prevenindo, assim, doenças cardiovasculares (MESSINA *et. al.* 1994). Este estudo teve como objetivos avaliar os teores de inibidor de tripsina de Kunitz e isoflavonas nas sementes em diferentes estádios de germinação da cultivar BRS 213 produzida nos campos experimentais da Embrapa Soja, em Londrina, PR.

## **Materiais e Métodos**

Aproximadamente 50 sementes de soja da cultivar BRS 213 foram germinadas em laboratório por dois e quatro dias, na ausência de luz. Para tanto, foram utilizados beakers de vidro contendo papel de germinação embebido em água destilada deionizada esterilizada. As sementes germinadas foram trituradas em micro moinho, desengorduradas a frio com n-hexano e submetidas às análises para determinação dos teores de inibidor de tripsina de Kunitz (KSTI) e de isoflavonas. Na determinação do teor de KSTI foi utilizado o método de Kakade *et al.* (1973) modificado por Hamerstrand *et al.* (1981). A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) utilizando-se um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para a separação das isoflavonas foi utilizado o sistema de gradiente linear binário tendo-se como fases móveis metanol contendo 0,025% de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e de H<sub>2</sub>O destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, atingindo-se 100% em 40 min e retornando à 20% novamente a 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas foi utilizada uma mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína da

marca Sigma. Esta solução foi preparada em metanol contendo um mix dos glicosídeos nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando os padrões como referência de acordo com a metodologia preconizada por Berhow, M., 2002.

## Resultados e Discussão

O teor de KSTI nas amostras germinadas foi menor quando comparado com o da soja não germinada. Nas sementes com dois dias de germinação houve uma redução no teor de inibidor e, aos quatro dias, o teor atingiu valores semelhantes àqueles das sementes não germinadas. Isto indica que, o processo de germinação poderia ser utilizado como uma alternativa para a produção de alimentos à base de soja e de rações para animais, empregando-se menos energia, para inativar o KSTI, reduzindo-se assim os custos de produção. O teor total das isoflavonas sofreu uma redução durante o processo de germinação. Com relação aos grupos de isoflavonas, foi verificada uma redução mais acentuada dos glicosídeos e das formas malonil, enquanto as agliconas (dadzeína e genisteína) apresentaram aumento no seu teor, quando comparado com a soja não germinada. A forma malonil-glicetina foi identificada na amostra após quatro dias de germinação. A gliciteína não mais foi identificada na amostra inicial, mas estava presente nas amostras com dois e quatro dias de germinação.

## Referências Bibliográficas

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). *Flavonoids in the living cell*. New York: Kluser Academic, 2002. p.61-76. (Adv. Exp. Méd. Biol. v. 505).

HAMERSTRAND, G.E.; BLACK, L.T.; GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 51, n. 1, p. 42-45, 1981.

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n.3 p. 376-382, 1974.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. **The simple soybean and your health**. New York: Avery, 1994. 260 p.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v.15, n. 2, p.306-315, 2000.

NELSON, A.I.; WEI, S.L.; STEINBERG, M.P. Foods from whole soybean. In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2.**, 1979, Corbinn. **Proceedings...** Corbinn, F.T.: Westview Press, Boulder, 1979. p.745-61.

RACKIS, J.J. Significance of soya trypsin inhibitors in nutrition. **Journal of The American Oil Chemists Society**, Champaign, v.58, n.3 p. 495-501, 1981.

## **Composição química de grãos de soja em estádio R-7 danificados por percevejo da soja**

Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; Andreia C. Santana<sup>1</sup>; José Marcos Gontijo Mandarino<sup>2</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

A soja é o principal produto agrícola de exportação do Brasil, sendo responsável pela alta tecnologia e crescimento do agronegócio brasileiro. A cultura da soja está sujeita a vários fatores climáticos, ambientais e biológicos tais como o ataque de doenças e pragas (CARRÃO-PANIZZI *et. al.* 1999). O percevejo da soja é uma praga importante, implicando em perdas econômicas consideráveis.

Cultivares tardias são mais susceptíveis ao ataque dos percevejos, já que, com a colheita das cultivares precoces, ocorre um aumento da pressão de pragas nestas cultivares tardias. Ao sugar o grão, o percevejo injeta toxinas no grão, bem como favorece o desenvolvimento de um fungo, causando uma série de reações que podem alterar a composição química do grão.

O objetivo desse estudo foi comparar a composição de proteína, lipídios, inibidor de tripsina Kunitz e isoflavonas, em grãos de soja em estádio R7, danificados e não danificados por percevejos.

### **Material e Métodos**

Grãos da linhagem BRM94-52273, colhidos em R7 em março de 2005, foram analisados para determinação de sua composição química. As análises foram conduzidas em base úmida e base seca; as proteínas foram analisadas pelo método de micro Kjeldahl, os lipídios por extração no destilador de Soxhlet, a umidade pelo método gravimétrico (AOCS, 1988). Na determinação do teor de inibidor de tripsina Kunitz foi utilizado o método de Kakade *et al.* (1973), modificado por Hamerstrand *et al.*, (1981). A

separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column), utilizando-se um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para a separação das isoflavonas, foi utilizado o sistema de gradiente linear binário, tendo-se como fases móveis: metanol contendo 0,025% de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e de H<sub>2</sub>O destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, atingindo-se 100% em 40 min e retornando à 20% novamente a 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas, foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas foi utilizada uma mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína da marca Sigma. Esta solução foi preparada em metanol contendo um mix dos glicosídeos nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando os padrões como referência, de acordo com a metodologia preconizada por Berhow, M., (2002).

## Resultados

Os resultados mostraram um aumento no teor de umidade da soja danificada, como consequência do dano e desenvolvimento do fungo no grão. A proteína não teve nenhuma alteração considerável, assim como os lipídios. O teor de inibidor de tripsina na soja danificada aumentou em relação à soja sadia. O teor das isoflavonas totais na soja danificada foi reduzido, enquanto que as formas agliconas aumentaram em relação à soja sadia. A gliciteína só foi detectada na soja danificada. Em grãos maduros de soja, a concentração de agliconas é insignificante, sendo que o aumento na concentração destes compostos nos grãos danificados pode ser devido à ativação da enzima b-glicosidase, responsável pela formação das formas agliconas na soja (CARRÃO-PANIZZI *et. al.*, 2000).

## Referências Bibliográficas

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 3. ed. Champaign, 1988. v.1-2.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: **BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). Flavonoids in the living cell**. New York: Kluser Academic, 2002. p.61-76. (Adv. Exp. Méd. Biol. v. 505).

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M.C.N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.5, p. 873-878, 2000.

HAMERSTRAND, G.E.; BLACK, L.T.; GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n. 1, p. 42-45, 1981.

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; McGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n.3 p. 376-382, 1974.

## Composição química de soja verde para consumo como hortaliça

---

Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; Cléverson R. Urrutia<sup>2</sup>; Andreia C. Santana<sup>1</sup>; José Marcos Gontijo Mandarino<sup>2</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

A soja apresenta diferentes estádios de desenvolvimento classificados como R1 (emergência) até R8 (colheita). O consumo de soja verde em estágio R6 é uma forma de utilização saudável e saborosa, porque a soja se constitui numa hortaliça de alto valor nutritivo. Neste estágio o teor de umidade é alto, o que confere bom sabor e textura ao grão. Os outros componentes como proteína, lipídios, carboidratos, inibidor de tripsina Kunitz, e isoflavonas apresentam teores diferenciados nos diferentes estádios de crescimento.

A soja verde (estádios R6 e R7) tem grande aceitação na alimentação humana pelas culturas orientais, sendo popular o “edamame”, prato tradicional da culinária japonesa, no qual as vagens são fervidas com água e sal e consumidos os grãos.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a composição química da linhagem BRM94-52273 em estágio R6, proveniente do projeto de melhoramento de soja para consumo humano da Embrapa Soja. Esta linhagem será recomendada para uso comercial e se ajusta ao consumo como soja verde ou hortaliça.

As isoflavonas são substâncias naturalmente presentes nos grãos de soja, que apresentam variação na concentração, dependendo da genética da planta e de fatores ambientais (temperaturas altas reduzem a concentração destes compostos) (CARRÃO-PANIZZI *et. al.* 1999). Isoflavonas são moléculas que podem ter 12 estruturas diferentes, algumas delas presentes somente no hipocótilo da semente, onde o teor de isoflavonas é 5 à 6

vezes maior do que no resto do grão, e estão ausentes no tegumento (KUDOU *et al.*, 1991). Isoflavonas também são chamadas de fitoestrógenos, porque apresentam estrutura semelhante ao hormônio estrógeno. Esta característica faz com as isoflavonas atuem na redução dos sintomas da menopausa, além de diminuir os riscos do câncer de mama (MESSINA *et al.*, 1994).

## Material e Métodos

Grãos da linhagem BRM94-52273, colhidos em R6 e R7 em março de 2005, foram analisados para sua composição química. As análises realizadas foram proteínas, analisadas pelo método de micro Kjeldahl, os lipídios por extração no destilador de Soxhlet, a umidade pelo método gravimétrico (AOCS, 1988). Na determinação do teor de inibidor de tripsina Kunitz foi utilizado o método de Kakade *et al.*, 1973, modificado por Hamerstrand *et al.*, 1981. A separação e a quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) utilizando-se um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para a separação das isoflavonas foi utilizado o sistema de gradiente linear binário tendo-se como fases móveis metanol contendo 0,025% de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e de H<sub>2</sub>O destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, atingindo-se 100% em 40 min e retornando à 20% novamente a 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas foi utilizada uma mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína da marca Sigma. Esta solução foi preparada em metanol contendo um mix dos glicosídeos nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando os padrões como referência de acordo com a metodologia preconizada por Berhow, M., 2002.



## Resultados

No estádio R6 o teor de umidade foi 67%, diminuindo para 12% no estádio R8, conforme prossegue a maturação da semente. O teor de proteína nos estádios analisados variou de 36% a 40% (base seca), respectivamente em R6 e R8, mostrando que, a partir de R6, o teor de proteína se manteve relativamente estável. O teor de proteína em base úmida variou de 12% a 35% (R6 a R8, respectivamente), como consequência do teor de umidade. Considerando a recomendação (FDA, 1991) de consumo de pelo menos 25g de proteína de soja, numa dieta saudável para um adulto, o que corresponde à cerca de 62,5g do grão de soja seco(ou de farinha de soja) no caso da soja hortalíça seriam necessários 210g de grãos de soja verde. Devido ao sabor e textura muito agradáveis da soja verde, é fácil consumir esta quantidade numa dieta.

A concentração de lipídeos continuou aumentando até o estádio R8, enquanto o inibidor de tripsina Kunitz aumentou do R6 até o final do R7, depois do qual houve uma diminuição no seu teor até o amadurecimento.

As isoflavonas tiveram uma maior concentração nos estádios R6 a R7, com alta concentração das formas malonil (42,19 mg de isoflavonas por grama de amostra desengordurada), enquanto as formas glicosídicas apresentaram uma pequena variação de 7,32 para 5,25 mg de isoflavonas por grama de amostra desengordurada, e as formas agliconas diminuíram até o final de R-8, de 10,00 para 15,19 mg de isoflavonas por grama de amostra desengordurada. As formas glicitina, encontradas em maior quantidade no hipocótilo, sofreram redução na concentração durante o amadurecimento do grão. As formas agliconas que são dependentes de condições de processamento, para seu desenvolvimento, encontram-se em quantidades muito reduzidas nos grãos verdes e secos. A soja verde ou hortalíça tem boas características nutricionais para ser usada no consumo humano.

## Referências Bibliográficas

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 3. ed. Champaign, 1988. v.1-2.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: **BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). Flavonoids in the living cell.** New York: Kluser Academic, 2002. p.61-76. (Adv. Exp. Méd. Biol. v. 505).

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M.C.N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Food labeling: general requirements for health claims for food. Fed Regist. v. 56, p. 60537-60566, 1991.

HAMERSTRAND, G.E.; BLACK, L.T.; GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n. 1, p. 42-45, 1981.

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n.3 p. 376-382, 1974.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonil isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glicine max Merrill*). **Agriculture and Biological Chemistry**. v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

## **Comparação entre dois métodos para a extração de isoflavonas em cultivares de soja**

---

Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; Andreia C. Santana<sup>1</sup>; José Marcos Gontijo Mandarino<sup>2</sup>; Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

As isoflavonas são compostos de baixo peso molecular, metabólitos secundários de plantas, pertencentes ao grupo do flavonóides e que possuem três anéis benzeno ligados (RHODES, 1996). Os diferentes radicais ligados a estes anéis dão origem a doze formas de isoflavonas, divididas em quatro grupos: as formas malonil, as formas acetil, os glicosídeos e as agliconas. As diferentes conformações desses radicais em cada grupo, originam as diversas formas das isoflavonas daidzina, genistina, glicitina e ainda as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína (PARK et al., 2001).

As formas malonil são as mais abundantes na soja *in natura*, quando os grãos são submetidos a processamentos com alta temperatura e pressão, estas formas são convertidas nas formas acetil, e estas, nas formas glicosídicas (PARK et al., 2001). Os processos fermentativos podem converter os glicosídeos as formas agliconas, devido ao aumento na atividade da enzima b-glicosídeo (CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R., 2000). As características genéticas da semente bem como as condições climáticas (temperatura), influenciam no teor de isoflavonas nos grãos. Sua síntese ocorre por volta de 35 dias após o florescimento e, aos 50 dias, ocorre um aumento na síntese de genistina e malonil-genistina. Entretanto, as formas daidzina e malonil-daidzina estão presentes em altas concentrações durante todo o período de maturação das sementes (CARRÃO-PANIZZI, et al. 1999). As isoflavonas concentram-se no hipocótilo da semente e não são encontradas no tegumento. As isoflavonas têm estrutura química semelhante à do hormônio estrógeno sendo, por-

tanto, eficazes no alívio dos sintomas do climatério (menopausa) e na redução dos riscos de câncer hormônio dependentes, como os cânceres de mama, colo de útero e próstata (MESSINA *et. al.*, 1994) O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos para a extração das isoflavonas presentes nas sementes de soja e sua subsequente quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **Materiais e Métodos**

Para tanto foi utilizada a cultivar BRS 213 produzida nos campos experimentais da Embrapa Soja em Londrina, PR. Foram comparados os métodos de extração com Metanol:DMSO (8:2) e Etanol com 0,1% de ácido acético. No procedimento de extração das isoflavonas foram realizadas as seguintes variações: tempo de extração (uma hora e 17 horas), natureza da amostra (integral e desengordurada). A separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (YMC Pack ODS-AM Column) utilizando-se um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 2690, com injetor automático de amostras. Para a separação das isoflavonas foi utilizado o sistema de gradiente linear binário tendo-se como fases móveis metanol contendo 0,025% de ácido TFA (ácido trifluoroacético) (solvente A) e de H<sub>2</sub>O destilada deionizada ultrapura contendo 0,025% ácido TFA (solvente B). A condição inicial do gradiente foi de 20% para o solvente A, atingindo-se 100% em 40 min e retornando à 20% novamente a 41 min. O tempo total de corrida foi de 60 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a corrida foi de 25 °C. Para a detecção das isoflavonas foi utilizado o detector de arranjo de foto diodo da marca Waters, modelo 996, ajustado para o comprimento de onda de 260 nm. Para a identificação das isoflavonas foi utilizada uma mistura dos padrões de daidzina, daidzeína, genistina e genisteína da marca Sigma. Esta solução foi preparada em metanol contendo um mix dos glicosídeos nas seguintes concentrações: 0,00625 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,0250 mg/mL; 0,0500 mg/mL e 0,1000 mg/mL. A quantificação das isoflavonas por padronização externa (área dos picos) foi realizada utilizando os padrões como referência.

## Resultados e Discussão

Na comparação entre os métodos, a modificação no tempo de extração de uma hora para 17 horas com o extrator de etanol 0,1% de ácido acético não mostrou diferença na extração das isoflavonas. Portanto, não se faz necessário aumentar o tempo de extração, quando este método é utilizado. Também não houve diferenças significativas quando foram utilizadas amostras desengordurada ou integral.

Entretanto, durante a análise cromatográfica, o ruído de fundo foi menor quando se utilizou amostra desengordurada, causando portanto menos danos à coluna. Portanto o método mais eficiente para extração das isoflavonas foi de Góes-Favoni et al., 2001 com 1 hora de extração e amostra desengordurada. Entretanto, para que a análises seja realizada de maneira mais rápida e sem prejuízo na extração das isoflavonas pode ser utilizada amostra integral, com a ressalva de que este procedimento pode diminuir a vida útil da coluna.

## Referências Bibliográficas

- BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: **BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). Flavonoids in the living cell.** New York: Klusher Academic, 2002. p.61-76. (Adv. Exp. Méd. Biol. v. 505).
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M.C.N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BORDIGNON, J.R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.5, p. 873-878, 2000.
- GÓES-FAVONI, S.P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KIKUCHI, A. Isoflavonas da soja: extração e determinação. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4., 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: SBCTA, 2001. p. 66.

MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. **The simple soybean and your health**. New York: Avery, 1994. 260 p.

RHODES, M.J.C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. **Proceedings of The Nutrition Society**, Cambridge, v.55, n. 1B, p.371-384, 1996.

PARK, Y.K.; AGUIAR, L.C.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, n.3, p. 156-160, 2001.

## **Determinação do inibidor de tripsina de kunitz em soja crua e tratada de cultivares brasileiras**

---

Wladimir S. Crancianinov<sup>1</sup>; Andreia C. Santana<sup>1</sup>; Adriana M. Freitas<sup>1</sup>; José Marcos Gontijo Mandarinho<sup>2</sup>; Vera de Toledo Benassi<sup>2</sup>. <sup>1</sup>UEL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

A tripsina é uma enzima secretada pelo pâncreas, que tem como função digerir as proteínas ingeridas. Os inibidores de tripsina, que podem ser encontrados em batatas, ovos e algumas leguminosas, como a soja, têm a capacidade de se ligar à enzima tripsina, impedindo sua ação sobre as proteínas. Os inibidores de tripsina são enzimas, as quais se desnaturam com o aumento de temperatura, ou seja, modificam sua estrutura espacial e deixam de atuar. Existem dois grupos principais de inibidores: o de Bowman-Birk e o de Kunitz, sendo que este último é mais facilmente inativado por tratamento térmico.

O inibidor de tripsina costumava ser considerado como um fator anti-nutricional e, portanto, indesejável nos alimentos. No entanto, alguns estudos têm investigado sua ação anti-cancerígena, tendo se verificado, em teste de laboratório, uma ação efetiva na inibição de genes do câncer de mama, pele, bexiga, cólon, pulmão, pâncreas, boca e esôfago, além de proteger as células do efeito da radiação e dos radicais livres.

Como não é comum o consumo humano de soja crua, as quantidades de inibidor de tripsina ingeridas pelo homem são muito pequenas para que se possa considerá-lo como um fator anti-nutricional relevante, embora possa ainda ser eficaz na redução de riscos de câncer. A maioria dos produtos de soja processada comercialmente apresenta alguma atividade residual (5-20% do valor inicial) do inibidor de tripsina, uma vez que, para eliminá-lo totalmente, o tratamento térmico necessário poderia pro-

vocar diminuição do valor nutricional das proteínas, bem como perda de suas propriedades funcionais (tecnológicas).

O efeito do tratamento térmico aplicado no processamento depende de vários fatores como: tempo de aquecimento, umidade do material e do meio, tamanho das partículas e temperatura utilizada. O calor úmido é mais eficiente do que o calor seco na inativação do inibidor de tripsina. A fervura dos grãos inteiros, em água, por 20 minutos, inativa a maior parte dos inibidores de tripsina e, se os grãos forem macerados em água por 8 horas, 5 minutos de fervura são suficientes. Métodos usando calor seco, como tostagem e extrusão também são efetivos. Num processo de extrusão a seco, a 135-145°C, velocidade de rosca de 550 rpm, bastam 30 segundos.

## **Objetivo**

Determinar a atividade do inibidor de tripsina de Kunitz (KSTI) em grãos de soja tratados termicamente, em comparação com a atividade do inibidor em grãos crus, de cultivares geneticamente diferentes quanto ao teor de KSTI.

## **Materiais e Métodos**

O inibidor de tripsina de Kunitz (KSTI) foi quantificado em três cultivares de soja (BRS 155, BRS 213 e BRS 216) desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Soja, utilizando-se o método de Kakade et al.(1973), modificado por Hamerstrand et al. (1981). Foram analisadas amostras de farinha obtidas a partir da moagem de grãos crus e de grãos previamente submetidos a um tratamento térmico em estufa. Todas as farinhas foram desengorduradas a frio com hexano, por quinze horas, sob agitação constante, e a atividade do inibidor foi calculado na média de três repetições.

## **Resultados e Discussão**

As amostras que passaram pelo tratamento térmico apresentaram um teor de inibidor de tripsina (KSTI) inferior ao das farinhas cruas obtidas



dos mesmos cultivares. A BRS 155 apresentou uma variação de 10,65 para 6,13 mg de KSTI por g de amostra desengordurada, a BRS 213 oscilou de 27,23 para 12,63 mg de KSTI por g de amostra desengordurada e a BRS 216 de 18,70 para 11,93 mg de KSTI por g de amostra desengordurada.

Embora a redução observada no teor do inibidor de tripsina tenha sido considerável, foi bastante inferior aos dados da literatura citados na introdução. Isso possivelmente foi devido ao tratamento utilizado, que constou de calor seco a uma temperatura não muito elevada.

### Referências Bibliográficas

- HAMERSTRAND, G.E.; BLACK, L.T.; GLOVER, J.D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry** 51: 42-45, 1981.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry** 51: 376-382, 1974.
- MESSINA, M.; MESSINA, V.; SETCHELL, K. Anticarcinogen: a big word that can save your life. In: \_\_\_\_\_. The simple soybean and your health. New York: Avery Publishing Group, 1994. p. 63-70.
- RACKIS, J.J. Significance of soya trypsin inhibitors in nutrition. **Journal of The American Oil Chemists Society** 58: 495-501, 1981.
- TROLL, W.; KENNEDY, A. Meeting report. Workshop report from the Division of Cancer Etiology, National Cancer Institute, National Institutes of Health. **Cancer Research** 49: 499-502, 1989.



---

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Centro Nacional de Pesquisa de Soja**

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Caixa Postal, 231 - CEP: 86001-970 - Londrina - Paraná

Telefone: (43) 3371 6000 - Fax: (43)3371 6100

homepage: [www.cnpso.embrapa.br](http://www.cnpso.embrapa.br) - e-mail: [sac@cnpso.embrapa.br](mailto:sac@cnpso.embrapa.br)



**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

**Governo  
Federal**