

## Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupí<sup>(1)</sup>

Marcelo Ferreira Fernandes<sup>(2)</sup>, Roberta Pereira Miranda Fernandes<sup>(3)</sup> e Mariângela Hungria<sup>(4)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente sete estirpes de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe com alta eficiência de fixação biológica do N<sub>2</sub> em associação com guandu (*Cajanus cajan*) e caupí (*Vigna unguiculata*). A amplificação do DNA pela técnica de PCR (polymerase chain reaction) com o oligonucleotídeo específico BOX indicou um grau elevado de diversidade genética, uma vez que todas as estirpes apresentaram perfis únicos de DNA. A análise por BOX-PCR revelou, ainda, que essa metodologia é eficiente para diferenciar estirpes, mas não para a diferenciação de espécies de rizóbio. Pela técnica do RFLP (restriction fragment length polymorphism) da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA e da região intergênica entre os genes 16S e 23S rRNA, com cinco enzimas de restrição, bem como pelo seqüenciamento parcial da região do 16S rRNA, foi possível classificar as estirpes nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Houve coerência entre as análises envolvendo a região do 16S rRNA, mas o agrupamento com uma das estirpes diferiu pela análise do espaço intergênico. Os resultados obtidos com a estirpe R11 indicam variabilidade genética elevada em relação às espécies de rizóbios descritas, inclusive diferindo em diversas bases da região do 16S rRNA, e podem indicar uma nova espécie.

Termos para indexação: *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata*, biologia molecular, fixação de nitrogênio, marcador genético.

### Genetic characterization of indigenous rhizobia strains from the coastal tableland efficient for the pigeonpea and cowpea crops

Abstract – The objective of this work was to characterize genetically seven indigenous rhizobial strains from the coastal tableland of Sergipe, Brazil, with high efficiency of biological nitrogen fixation with the pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) crops. The DNA amplification with the PCR (polymerase chain reaction) technique and the specific primer BOX indicated a high level of genetic diversity, with all isolates showing unique profiles of DNA. The BOX-PCR analysis also indicated that this method is efficient to characterize strains but not to define rhizobial species. The RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of the 16S rRNA region and of the intergenic region between the 16S and the 23S rRNA genes with five restriction enzymes, as well as the partial sequencing of the 16S rRNA region allowed the classification of the strains into the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. There was an agreement between the results obtained by the analysis of the 16S rRNA region, but one strain differed when the intergenic space was considered. The results obtained with strain R11 showed a high level of genetic diversity when compared to the described rhizobial species, including differences in several bases of the 16S rRNA region, and might indicate a new species.

Index terms: *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata*, molecular biology, nitrogen fixation, genetic markers.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 11 de março de 2003.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, CEP 49025-040 Aracaju, SE. E-mail: Marcelo.Fernandes@orst.edu

<sup>(3)</sup> Universidade Federal de Sergipe, Dep. de Fisiologia, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/nº, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000 São Cristóvão, SE. E-mail: fermanro@onid.orst.edu

<sup>(4)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq. E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

### Introdução

A região dos tabuleiros costeiros estende-se pela costa brasileira do Amapá ao Rio de Janeiro, compreendendo platôs de origem sedimentar com grau variável de entalhamento. Embora os tabuleiros costeiros de Sergipe sejam de grande importância para a agricultura do Estado, não há praticamente trabalhos sobre seleção de estirpes de rizóbios adaptadas a esse ecossistema para a inoculação em leguminosas nativas.

A inoculação de estirpes de rizóbio recomendadas em outras regiões do País não tem resultado em incrementos nas taxas de fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) e crescimento de caupi e guandu em solos dos tabuleiros costeiros de Sergipe (Barreto & Fernandes, 1998). Recentemente, porém, foram identificadas algumas estirpes nativas dos tabuleiros com capacidade elevada de FBN em associação com essas leguminosas (Fernandes & Fernandes, 2000; Fernandes et al., 2003). A caracterização preliminar dessas estirpes indicou tolerância a temperaturas altas (35°C) e a concentrações elevadas de Al (10 mg L<sup>-1</sup>), bem como tolerância a concentrações elevadas de diversos antibióticos (Fernandes & Fernandes, 2000; Fernandes et al., 2003).

Consideráveis avanços foram conseguidos, nos últimos anos, pelo emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade de rizóbio. Destaca-se, entre essas, a análise de PCR (Polymerase Chain Reaction, análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de seqüências definidas da molécula do DNA, associada ao método do RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), em geral com amplificações de regiões de genes cromossômicos conservados mas com variabilidade suficiente para detectar diferenças entre gêneros e espécies, como o 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaço intergênico (IGS, Intergenic Space) entre estas duas regiões; os fragmentos obtidos após a amplificação são, em seguida, digeridos por enzimas de restrição que reconhecem, em geral, de 4 a 5 pares de bases (Young et al., 1991; Laguerre et al., 1996; Terefework et al., 1998; Tesfaye & Holl, 1998; Vinuesa et al., 1998; Chueire et al., 2000a; Tan et al., 2001). Esses métodos permitem discriminar, inclusive, linhagens geneticamente relacionadas. Tomando-se por base um determinado grau de variabilidade, o seqüenciamento de bases dessas regiões gênicas é efetuado, permitindo a definição precisa das espécies (Garrity & Holt, 2001). Nos estudos de diversidade genética têm sido freqüentemente utilizadas, ainda, análise de PCR com primers específicos, como o BOX, ERIC e REP, e os perfis dos produtos obtidos após a reação permitem a diferenciação das estirpes (Versalovic et al., 1991, 1994; De Bruijn, 1992; Selenska-Pobell et al.,

1995; Hungria et al., 1998; Santos et al., 1999; Chueire et al., 2000b; Mostasso et al., 2002).

Embora esforços estejam sendo alocados na identificação de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros capazes de estabelecer simbioses eficazes com as leguminosas normalmente utilizadas na região (Fernandes & Fernandes, 2000; Fernandes et al., 2003), nenhum estudo de caracterização genética foi conduzido com essas estirpes.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente sete estirpes de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe que haviam se destacado pela alta eficiência de FBN em associação com guandu e caupi.

### Material e Métodos

Foram caracterizadas cinco estirpes isoladas de nódulos de guandu (*Cajanus cajan*), R01, R11, R35, R43 e R45, e duas isoladas de caupi (*Vigna unguiculata*), R05 e R17. As estirpes R17, R35, R43 e R45 foram selecionadas por Fernandes et al. (2003) e as demais por Fernandes & Fernandes (2000). Os locais de isolamento, velocidade de crescimento e alteração do pH em meio de cultura contendo extrato de levedura e manitol – YMA (yeast mannitol agar, Vincent, 1970) constam na Tabela 1.

Em referência às caracterizações moleculares, foram utilizadas quatro estirpes recomendadas comercialmente para a cultura da soja (*Glycine max*), *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7) e *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 (=29W), provenientes do banco de germoplasma de rizóbio da Fepagro (Fundação de Pesquisa Agropecuária, Porto

**Tabela 1.** Estirpes de rizóbio e respectivos hospedeiros, locais de isolamento no Estado de Sergipe, velocidade de crescimento e alteração do pH em YMA com indicador de azul de bromotimol.

Estirpe	Hospedeiro	Local	Velocidade de crescimento <sup>(1)</sup>	pH <sup>(2)</sup>
R01	Guandu	N.S. Dores	R	Ácido
R05	Caupi	Aracaju	R	Ácido
R11	Guandu	Lagarto	R	Ácido
R17	Caupi	Umbaúba	L	Alcalino
R35	Guandu	N.S. Dores	L	Neutro
R43	Guandu	N.S. Dores	L	Neutro
R45	Guandu	Aracaju	L	Alcalino

<sup>(1)</sup>Classes de crescimento determinadas de acordo com o número de dias para que colônias isoladas atingissem 1 mm de diâmetro: de 3 a 5 dias, rápido (R) e de 8 a 10 dias, lento (L). <sup>(2)</sup>pH avaliado ao final de 5 ou 10 dias de crescimento, para as estirpes de crescimento rápido ou lento, respectivamente.

Alegre, RS). Além destas, as seguintes estirpes foram utilizadas como referência: *Rhizobium tropici* IIB CIAT 899<sup>T</sup> (=SEMIA 4077, =UMR 1899, =USDA 9030, =TAL 1797, =HAMBI 1163, =ATCC 49672), recebida do Centro de Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México e *R. tropici* SEMIA 4080 (=PRF 81), proveniente da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, ambas recomendadas comercialmente para a cultura do feijoeiro. Foram utilizadas, ainda, as estirpes-padrão H152<sup>T</sup>, de *R. giardinii* bv. *giardinii* e R602<sup>T</sup>, de *R. gallicum* bv. *gallicum*, recebidas do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Dijon, França.

As bactérias cresceram em meio YM (Vincent, 1970) sem ágar, modificado (contendo 5,0 g L<sup>-1</sup> de manitol), por três dias para rizóbio de crescimento rápido e cinco dias para rizóbio de crescimento lento. As bactérias foram centrifugadas a 12.000 rpm e lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS 1 X, contendo, em 500 mL, 4,383 g de NaCl 150 mM; 0,1793 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 2,6 mM; 1,36 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 7,6 mM). As bactérias foram ressuspensas em 400 mL de TE 50/20 e receberam 50 µL de SDS (sodium dodecyl sulphate) a 10%; 5 µL de proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>); 10 µL de lisozima (5 mg mL<sup>-1</sup>); 1 µL de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>, preparada em Tris HCl 10 mM pH 7.5 e NaCl 15 mM) e incubada a 37°C por 1 hora. A seguir, as amostras foram passadas três vezes por seringa, para retirar a viscosidade, seguindo-se a adição de NaCl e acetato de sódio em concentrações finais de 250 mM e 300 mM, respectivamente. As amostras foram armazenadas a -20°C.

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR (polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase) com o oligonucleotídeo (primer) BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic et al., 1994). A reação de amplificação foi realizada com os seguintes volumes: água milli-Q estéril, 12,3 µL; dNTPs, 5,0 µL (estoque com 1,5 mM de cada base); tampão 10X, 2,5 µL; MgCl<sub>2</sub>, 3,0 µL (20 mM); oligonucleotídeo, 1,0 µL (50 pmol µL<sup>-1</sup>); DNA, 1,0 µL (50 ng); Taq, 0,2 µL (5 U/µL). A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); um ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 100 V em gel de agarose a 1,5% (20x25 cm), em tampão TBE 1 X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução) que, após seis horas, foi corado com brometo de etídio e fotografado.

As bandas foram analisadas pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) e, para o agrupamento, foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean, Sneath & Sokal, 1973) e o coeficiente de Jaccard ou o de Pearson.

Após a extração do DNA das bactérias, procedeu-se à amplificação pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (Young et al., 1991) e Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3'), que amplificam, aproximadamente, 1.500 pares de bases (pb), compreendendo quase toda a região do DNA que codifica o gene 16S rRNA. O sistema para reação de amplificação foi realizado com cinco repetições, em uma mistura com volume final de 50 µL, constituída de: 38,30 µL de água milli-Q estéril; 2,0 µL de dNTPs (estoque contendo 1,5 mM de cada base); 5,0 µL de tampão 10 X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (Y1 e Y3, na concentração de 10 pmol µL<sup>-1</sup>); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>); 2,0 µL de DNA (50 ng). O ciclo para a amplificação de Y1 e Y3 foi o recomendado por Young et al. (1991), com um incremento de 2°C na temperatura de anelamento, consistindo de: um ciclo de desnaturação inicial a 93°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação (45 s a 93°C), anelamento (45 s a 64°C) e extensão (2 min a 72°C); um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min; manutenção a 4°C. Foi utilizado, então, o método de Laguerre et al. (1996) para o RFLP (restriction fragment length polymorphism, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), com enzimas que reconhecem quatro ou cinco pares de base. O produto da amplificação com Y1 e Y3 foi digerido com as enzimas de restrição *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* e *RsaI*. Para cada enzima, foi preparada uma mistura contendo: 6 µL do produto do PCR; 1 µL do tampão específico para cada enzima (10 X); 0,5 µL da enzima (5 U reação<sup>-1</sup>) e 2,5 µL de água milli-Q estéril. Para a *NdeII*, a mistura incluiu 1 µL da enzima; 1 µL de DTT (10 mM); 6 µL do produto de PCR; 1 µL do tampão e 1 µL de água. As misturas foram incubadas durante a noite em banho-maria a 37°C. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel horizontal (17x11 cm) com 3% de agarose, em TBE 0,5 X, a 100 V por 4 horas.

O DNA das bactérias também foi amplificado com oligonucleotídeos que codificam a região intergênica entre o 16S rRNA e o 23S rRNA, FGPS 1490 (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3') e FGPS 132' (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') (Laguerre et al., 1996) e os seguintes ciclos: um ciclo de 3 min a 95°C; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 55°C) e de extensão (2 min a 72°C); um ciclo final de 3 min a 72°C e manutenção a 4°C. As bandas obtidas

foram analisadas com o programa Bionumerics, conforme referido.

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação com os oligonucleotídeos Y1 e Y3 foram purificados utilizando o kit “Concert Rapid PCR Purification System” (Gibco BRL) e quantificados. Os fragmentos de PCR (70 ng para a reação com Y1 e 40 ng para Y2) foram amplificados novamente utilizando os oligonucleotídeos Y1 e Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Young et al., 1991) (oligonucleotídeos na concentração de 3,2 pmol mL<sup>-1</sup>) e o kit “Big Dye” (PE Applied Biosystem), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados os seguintes ciclos para a amplificação: 95°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s, anelamento a 50°C por 5 s; extensão a 60°C por 4 min. Os produtos de extensão foram precipitados com 80 mL de isopropanol a 75%, homogeneizados, deixados à temperatura ambiente por 15 min e centrifugados a 12.000 rpm por 20 min a 25°C. O sobrenadante foi completamente removido, adicionaram-se 250 µL de isopropanol 75%, realizando-se a mistura em um vórtex. Cada amostra foi centrifugada novamente por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e a amostra foi aquecida a 90°C por 1 min, para evaporar o restante do sobrenadante. As amostras foram ressuspensas em 8 µL de tampão (formamida e azul de dextran, 5:1, v/v) e aquecidas por 2 min a 94°C, seguindo-se um choque térmico em gelo. Para o seqüenciamento, 2 µL de cada amostra foram aplicados em um gel de poli-acrilamida (Long Ranger Singel Packs, Produtos FMC) e as seqüências foram determinadas em um seqüenciador ABI 377 da Perkin Elmer, na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja. As seqüências confirmadas nas direções 3' e 5' foram submetidas ao “GenBank database” (National Center for Biotechnology Information, 2002) para buscar alinhamentos significativos.

Na análise filogenética, as seqüências obtidas neste trabalho foram alinhadas com as seqüências das seguintes estirpes, obtidas no “GenBank database” (National Center for Biotechnology Information, 2002) (número de acesso entre parênteses): *B. japonicum* SEMIA 5079 (AF234888) e SEMIA 5080 (AF234889); *B. elkanii* SEMIA 587 (AF234890) e SEMIA 5019 (AF237422); *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ATCC 8002 (M55494); *R. tropici* SEMIA 4080 (AF260274); *R. tropici* IIALMG 9518 (X67233.1); *R. tropici* IIB CIAT 899<sup>T</sup> (U89832); *R. gallicum* bv. *gallicum* R602sp<sup>T</sup> (U86343); *R. giardinii* bv. *giardinii* H152<sup>T</sup> (U86344); *Rhizobium* espécie genômica Q estirpe BDV 5102 (Z94806) e *Rhizobium* sp. USDA 1920 (U89823). A análise filogenética foi realizada usando o algoritmo UPGMA e o programa Bionumerics.

## Resultados e Discussão

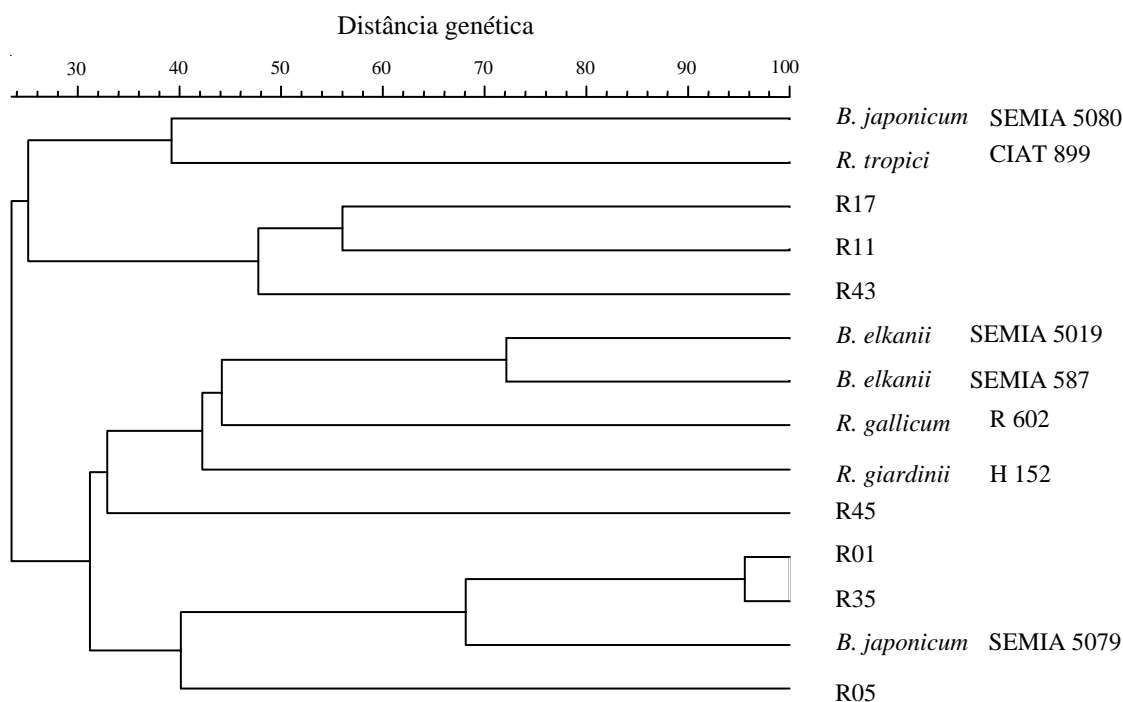
Diversos estudos de determinação das relações genéticas entre estirpes de rizóbio têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, como as seqüências REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergeneric consensus) e BOX, que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, normalmente no espaço intergênico (Versalovic et al., 1991, 1994; De Bruijn, 1992; Judd et al., 1993; Madrzak et al., 1995; Rossum et al., 1995; Selenska-Pobell et al., 1995; Laguerre et al., 1997; Hungria et al., 1998, 2000; Santos et al., 1999; Mostasso et al., 2002). O uso desses oligonucleotídeos específicos é vantajoso sobre aqueles não específicos porque, em uma única reação, obtém-se um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo suficientemente elevado para a análise genética das bactérias (Chueire et al., 2000b).

Pela análise por BOX-PCR, constatou-se que todas as estirpes apresentaram perfis únicos de DNA amplificado, com maior semelhança (95,6%) entre as estirpes R01 e R35, ambas capturadas por guandu (Figura 1). Com a estirpe R11 não foi conseguida boa amplificação, conforme pode ocorrer com algumas estirpes e esses oligonucleotídeos específicos (Judd et al., 1993) e, portanto, R11 não foi utilizada na análise conjunta. Os resultados confirmam a identidade única de cada estirpe, embora R01 e R35, pelo baixo grau de polimorfismo constatado, possam representar variantes de uma mesma estirpe, conforme relatado quanto a estirpes de soja pertencentes a sorogrupos norte-americanos (Judd et al., 1993) e quanto a estirpes adaptadas aos Cerrados brasileiros (Hungria et al., 1998; Santos et al., 1999). Por meio da análise que utilizou o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Pearson, que considera a densidade de cada uma das bandas obtidas, dois grandes grupos foram formados, unidos em um baixo nível de similaridade, de apenas 23,4%, mas não houve relação entre os agrupamentos obtidos e as espécies conhecidas de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Figura 1). Também não houve relação entre os agrupamentos e a origem das estirpes, conforme observado em isolados de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro, nos estudos conduzidos por Grange (2001)

e Mostasso et al. (2002). Os resultados obtidos neste estudo revelam diversidade genética elevada entre as estirpes nativas e confirmam que a análise por BOX-PCR é eficiente para discriminá-las, embora nem sempre seja adequada nas avaliações filogenéticas (Laguerre et al., 1997; Bangel, 2000; Chueire et al., 2000b).

No campo da filogenia de bactérias, grandes avanços têm sido obtidos pela análise de genes conservados, em especial a região que codifica o 16S rRNA, considerada como altamente conservada entre as bactérias mas, ao mesmo tempo, suficientemente variável e com uma quantidade elevada de informações, sendo capaz de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991; Young et al., 1991; Willems & Collins, 1993). A análise por RFLP dessa região tem mostrado, também, alta correlação com as relações filogenéticas, com a vantagem de maior simplicidade e menor custo em relação ao

seqüenciamento de bases (Laguerre et al., 1992, 1994, 1996, 1997). No presente trabalho, quando amplificadas com os oligonucleotídeos Y1 e Y3, as estirpes apresentaram um único produto com, aproximadamente, 1.500 pb, exceto com a R43 que, repetidamente, apresentou problemas na amplificação, o que também ocorreu com algumas combinações de estirpes e enzimas. Laguerre et al. (1996) também relataram que não foi possível obter amplificação dessa região com algumas estirpes, o que pode ocorrer por características específicas do DNA. Quando os produtos foram digeridos com cinco enzimas de restrição e as bandas analisadas com o algoritmo de UPGMA e o coeficiente de Jaccard, que considera a presença ou ausência de bandas, dois grandes grupos foram obtidos, e se uniram em um baixo nível de similaridade, de 25,7% (Figura 2). Houve coerência entre os grupos obtidos e os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e somente as estirpes R17 e R35 apresentaram perfis idênticos. Den-



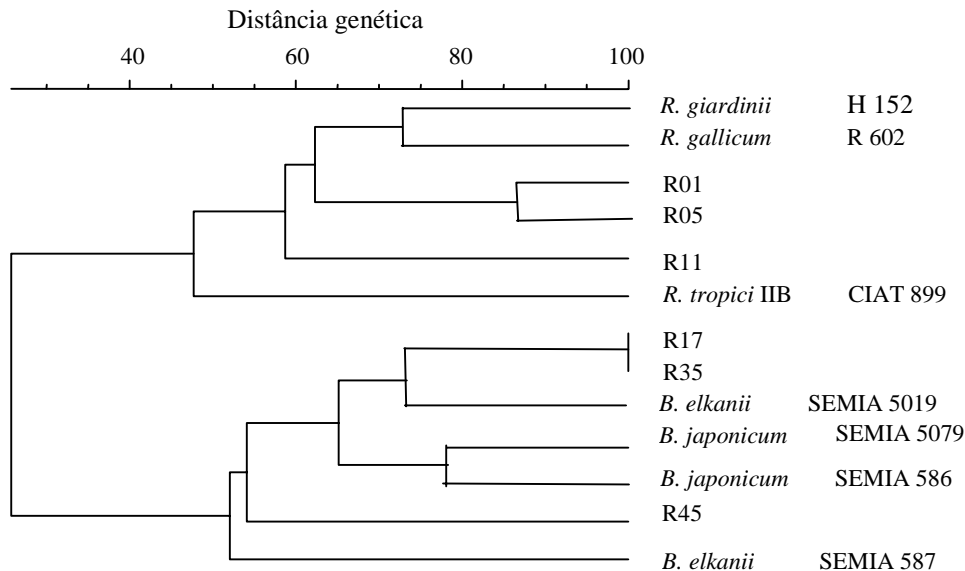
**Figura 1.** Dendrograma genético das estirpes isoladas de guandu e caupi e de estirpes representativas de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o oligonucleotídeo específico BOX. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Pearson.

tro do segundo grupo, porém, essa técnica não permitiu a separação entre as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, confirmando que esse método nem sempre é capaz de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, como *B. japonicum/B. elkanii* e *R. tropici/Agrobacterium* spp. (Laguerre et al., 1994; Chueire et al., 2000a).

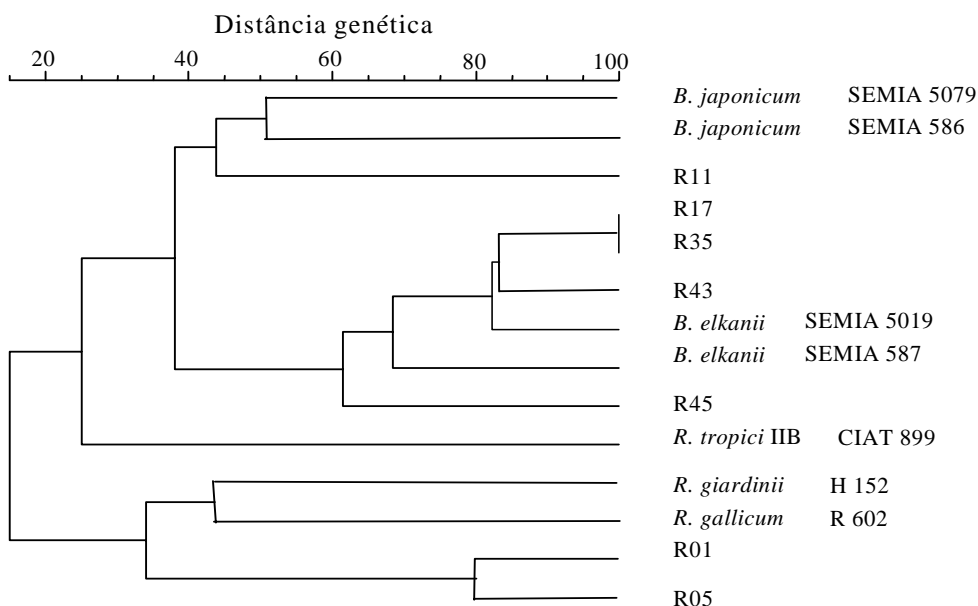
Tem sido sugerido que, no caso de espécies estreitamente relacionadas, um nível maior de diferenciação pode ser obtido pela análise do espaço intergênico entre o 16S e o 23S rDNA. No presente trabalho, quando os DNAs das estirpes foram amplificados com os oligonucleotídeos FGPS 1490 e FGPS 132', os fragmentos obtidos foram de tamanhos diversos e algumas estirpes apresentaram mais de um produto. Foram obtidos fragmentos com os seguintes pesos moleculares aproximados: R11, 1.124; R05, 1.603; R01, 1.630 e R45, 1.353. As estirpes R17, R35 e R43 produziram fragmentos de cerca de 1.414 pb e as estirpes R17 e R35 apresentaram fragmentos adicionais com 535 e 540 pb, respectivamente. A análise de RFLP desses produtos com cinco enzimas de restrição permitiu a separação das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, com um nível de similaridade de 38,1% (Figura 3). Contudo, a estirpe R11, com crescimento rápido e reação ácida (Tabela 1), foi agrupada com *B. japonicum*. Confirmaram-se, porém,

alguns resultados obtidos pelo RFLP-PCR da região 16S, como a similaridade elevada entre a R05 e a R01 e a similaridade total da R17 com a R35 (Figura 3).

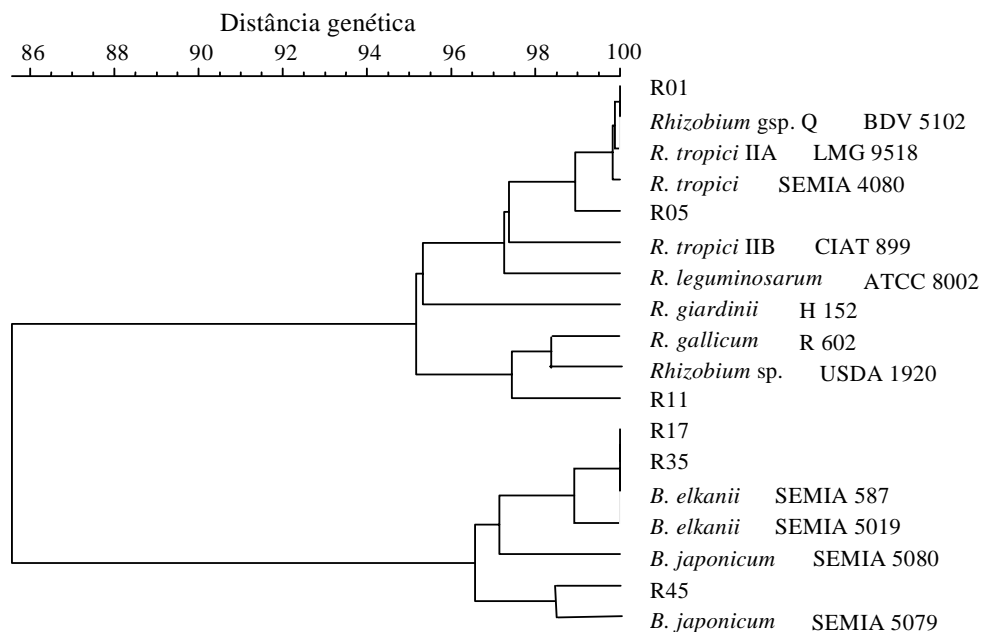
Seqüências parciais da região que codifica o 16S rRNA foram obtidas para as estirpes isoladas de guandu e caupi e somente as bases confirmadas nas direções 3' e 5' foram consideradas para a análise filogenética. Essas seqüências variaram de 519 a 634 pb e foram submetidas ao banco de dados "GenBank" (National Center for Biotechnology Information, 2002). A comparação com as seqüências do "GenBank" mostrou que a R01 apresentou identidade total com a estirpe BDV 5102, classificada como *Rhizobium* espécie genômica Q, provavelmente *R. tropici*, isolada de arbustos nativos na Austrália (Lafay & Burdon, 1998). As estirpes de *R. tropici* IIA LMG 9518 e *R. tropici* SEMIA 4080 também apresentaram similaridade elevada com a R01 e a estirpe R05 se uniu a esse grupo com um nível de similaridade de 98,9% (Figura 4). Já a estirpe R11 se uniu ao grupo da *R. gallicum* e *Rhizobium* sp. estirpe USDA 1920 em um nível de 97,4% e ao outro grupo de estirpes de *Rhizobium*, em um nível de 95,2%. Houve, portanto, coerência entre o seqüenciamento e a caracterização



**Figura 2.** Dendrograma genético das estirpes isoladas de guandu e caupi e de estirpes representativas de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos por RFLP-PCR da região correspondente ao 16S rRNA, com as enzimas de restrição *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* e *RsaI*. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



**Figura 3.** Dendrograma genético das estirpes isoladas de guandu e caupi e de estirpes representativas de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos por RFLP-PCR da região correspondente ao espaço intergênico entre o 16S rRNA e o 23S rRNA, com as enzimas de restrição *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* e *RsaI*. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



**Figura 4.** Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rRNA das estirpes isoladas de guandu e caupi e de estirpes representativas de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Análise realizada com o algoritmo UPGMA.

morfológica, bem como com o RFLP da região 16S rRNA. As estirpes de *B. japonicum* foram agrupadas em um nível de 96,6% e esse grupo apresentou uma similaridade de 85,6% com o gênero *Rhizobium*. As estirpes R17 e R35 apresentaram identidade total com a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587. A SEMIA 587, por sua vez, mostrou 99% de similaridade com *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup> (U35000), estirpe padrão dessa espécie (Chueire et al., 2000a). Já a R45 apresentou similaridade de 98,5% com *B. japonicum* SEMIA 5079 (Figura 4). As seqüências das estirpes R01, R05, R11, R17, R35 e R45 foram depositadas no “Genbank database” (National Center for Biotechnology Information, 2002) e receberam os números de acesso AY117670 a AY117675, respectivamente. A diferença entre o posicionamento da estirpe R11 quanto às características in vitro (Tabela 1), que concordam com as análises da região 16S rRNA (Figuras 2 e 4), mas que diferem da análise por RFLP do espaço intergênico 16S – 23S rRNA (Figura 3), reflete diferenças entre essas regiões gênicas que precisam ser melhor investigadas.

### Conclusão

Estirpes de rizóbio nativas da região dos tabuleiros costeiros, identificadas por apresentar capacidade elevada de fixação biológica do nitrogênio em associação com caupi e guandu, apresentam diversidade genética elevada entre si e são posicionadas taxonomicamente nos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

### Agradecimentos

À Lígia M. O. Chueire e Magda C. Ferreira, pelo auxílio nas análises; à Finep/CNPq/MICT, Programa de Grupos de Excelência, PRONEX e ao projeto EC-INCO, pelo apoio financeiro; às Dras. Maria de Fátima Loureiro (Universidade Federal de Mato Grosso) e Ieda de C. Mendes (Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados), pelas sugestões no manuscrito.

### Referências

BANGEL, E. V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da**

**soja no Mercosul.** 2000. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F. **Recomendação de leguminosas para adubação verde em solos dos tabuleiros costeiros.** Aracaju: Embrapa-CPACT, 1998. 5 p. (Comunicado Técnico, 28).

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro.** Londrina: Embrapa-CNPSO, 2000a. 32 p. (Boletim de Pesquisa, 3).

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000b.

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

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 321-327, 2000.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 835-842, jul. 2003.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 2001. p. 119-154.

GRANGE, L. **Diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) isolado de solos da Região Nordeste e da Região Sul do Brasil.** 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.



- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 393-399, 1998.
- JUDD, A. K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1702-1708, 1993.
- LAFAY, B.; BURDON, J. J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3989-3997, 1998.
- 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.
- LAGUERRE, G.; BERKUM, P. van; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4748-4758, 1997.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.
- LAGUERRE, G.; MAZURIER, S. I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 101, p. 17-26, 1992.
- MADRZAK, C. J.; GOLINSKA, B.; KRÓLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, B.; SADOWSKY, M. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1194-1200, 1995.
- 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**, Amsterdam, v. 73, p. 121-132, 2002.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (Bethesda, Estados Unidos). **Blast database**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 6 fev. 2002.
- ROSSUM, D. van; SCHUURMANS, F. P.; GILLIS, M.; MUYOTCHA, A.; VERSEVELD, H. W. van; STOUTHAMER, A. H.; BOOGERD, F. C. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1599-1609, 1995.
- SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian cerrados region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 261-272, 1999.
- SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 79, p. 425-431, 1995.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
- TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J. K.; REINHOLD-HUREK, B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16s-23s ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3655-3664, 2001.
- TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 349-356, 1998.
- TESFAYE, M.; HOLL, F. B. Group-specific differentiation of *Rhizobium* from clover species by PCR amplification of 23S rDNA sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1102-1105, 1998.

- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2096-2104, 1998.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, 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.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 305-313, 1993.
- WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 73, p. 2271-2277, 1991.