

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

Pâmela Menna¹; Fernando Gomes Barcellos²; Jesiane Stefânia da Silva Batista³; Eliane Bangel⁴; Rubens José Campo⁵; Mariangela Hungria⁵. ¹Bolsista de mestrado da CAPES; ²Bolsista de pós-doutorado do CNPq; ³Bolsista de mestrado da Embrapa; ⁴FEPAGRO; ⁵Embrapa Soja.

Introdução

Rizóbios são bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N₂) 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 N₂ 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 μL^{-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 μL^{-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 μL 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 μL 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

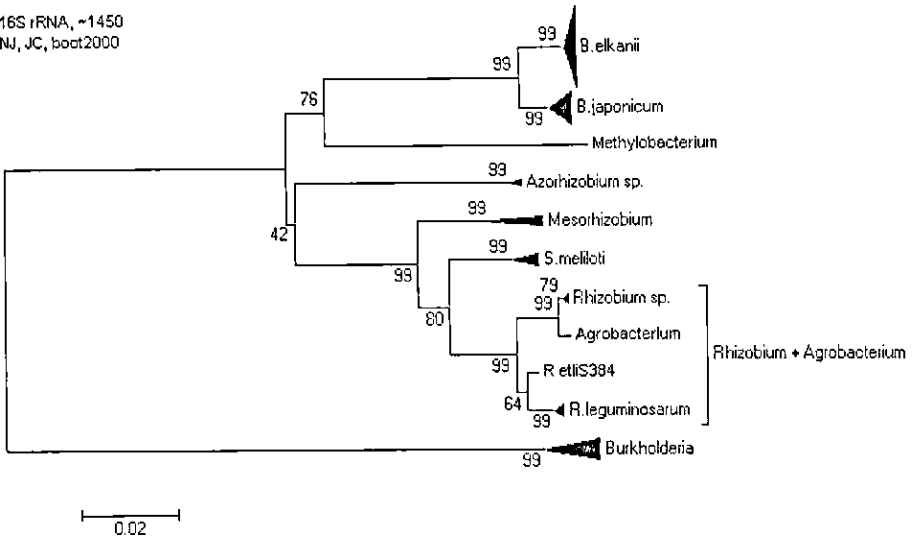


Figura 1. Árvore filogenética, baseada no seqüenciamento de gene 16S rRNA, de 68 estirpes simbiotes de 46 leguminosas e oficialmente recomendadas para o uso em inoculantes comerciais brasileiros, bem como de estirpes-tipo e estirpes utilizadas como referência das espécies de rizóbios. Análise considerando 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** 2nd 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.