

Diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes leguminosas, com base na análise do gene ribossomal 16S e dos genes de nodulação *nodY/KA*

Pâmela Menna¹; Jesiane Stefania da Silva Batista²; Fernando Gomes Barcellos³; Eliane Bangel⁴; Mariangela Hungria⁵. ¹Aluna de Doutorado Universidade Estadual de Londrina - Bolsista DTI CNPq; ²Aluna de Doutorado UEL - Bolsista CAPES; ³Bolsista pro-doc CNPq; ⁴FEPAGRO; ⁵Embrapa Soja.

Introdução

O gênero *Bradyrhizobium* inclui bactérias que formam simbioses específicas com determinadas leguminosas, tais como soja (*Glycine max*), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*), *Crotalaria juncea*, *Acácia* sp., *Lupinus* sp., siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e com a não leguminosa *Parasponia* sp. (You et al., 2002). Atualmente, existe um grande conhecimento sobre a genética das espécies *B. japonicum* (Fischer, 1994) e *B. elkanii* (Doberet et al., 1994) simbiotes de soja, no entanto, relativamente muito pouco se conhece sobre a genética das demais espécies, bem como as que nodulam distintas leguminosas.

Como em muitas outras bactérias, a análise da diversidade e taxonomia do gênero *Bradyrhizobium* tem sido derivada, principalmente, da análise das seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S (16S RNAr). O uso desse gene se deve à constatação de que ele é suficientemente conservado, o que permite o estabelecimento de relações evolucionárias universais, mas com variabilidade suficiente para permitir a classificação taxonômica (Menna et al., 2006).

A análise dos genes de nodulação, tais como os genes *nodABC*, também tem sido utilizada para determinar a diversidade genética e verificar possíveis eventos de transferência lateral de genes entre bactérias capazes de estabelecer simbiose, sendo que sua análise tem demonstrado um elevado grau de similaridade genética entre estirpes simbiotes de uma mesma

planta hospedeira (Hungria & Stacey, 1997). Ao contrário de *Rhizobium*, em *B. japonicum*, um gene adicional, *nodY*, precede o operon *nodABC*. Este mesmo gene tem sido identificado em *B. elkanii* e, devido a sua baixa homologia ao gene *nodY* de *B. japonicum*, tem sido denominado *nodK* (Doberet et al., 1994). Estudos têm demonstrado que os genes *nodY* ou *nodK*, podem estar relacionados à especificidade a *Glycine max* em espécies de *Bradyrhizobium* (You et al., 2002).

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 dessas estirpes. Embora essa coleção seja um reservatório de estirpes de rizóbios, resultantes de programas de seleção durante décadas, muito pouco se conhece sobre a diversidade e as relações genéticas existentes entre as mesmas e suas respectivas plantas hospedeiras, em regiões tropicais. Dessa Coleção, 68 estirpes foram previamente analisadas por Menna et al. (2006) e os resultados, com base no seqüenciamento do gene 16S RNAr, indicaram uma diversidade genética elevada, com indicativos de possíveis novas espécies.

O estudo dos genes de nodulação e fixação, assim como de outros genes relacionados à simbiose, podem levar à identificação de novas espécies, bem como à determinação de como esses genes são e estão sendo difundidos na natureza, estabelecendo assim, bases moleculares para o conhecimento sobre os processos evolutivos que levam à elevada diversidade nos trópicos. Desse modo, o estudo de coleções permitirá identificar genes determinantes da especificidade hospedeira e da eficiência no processo de fixação biológica do nitrogênio, bem como o desenvolvimento de marcadores moleculares para o uso em programas de seleção de estirpes.

Objetivo

Caracterizar a diversidade genética de 76 estirpes de *Bradyrhizobium*, através da análise do gene ribossomal 16S e dos genes de nodulação *nodYA* ou *nodKA*.

Desenvolvimento

Estirpes utilizadas

Foram analisadas 76 estirpes, provenientes da FEPAGRO, denominadas SEMIA (Secção de Microbiologia Agrícola), isoladas de 24 distintas leguminosas. Trinta dessas estirpes foram previamente classificadas com base nas seqüências do 16S RNAr, como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Menna et al., 2006).

Extração do DNA e amplificação por PCR da região do DNA, que codifica para o gene 16S RNAr e *nodYA* ou *nodKA*

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Menna et al. (2006). O gene ribossomal 16S RNAr foi obtido de 46 estirpes, utilizando os "primers" fD1 e rD1 conforme descrito por Weisburg et al. (1991), já os genes *nodYA* ou *nodKA* foram amplificados de todas as estirpes, utilizando os "primers" nodKup e nodAp4, conforme descrito por Sterner e Parker (1999). Posteriormente os produtos de PCR obtidos foram precipitados, utilizando o protocolo descrito por Menna et al. (2006). 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 dos gene 16S rRNA e *nodYA* ou *nodKA*

Os produtos de PCR obtidos de cada estirpe (80 ng por reação) foram seqüenciados conforme descrito por Menna et al. (2006), sendo que para os genes *nodYA* ou *nodKA* foram utilizados os mesmos "primers" descritos para a amplificação. As seqüências obtidas foram reunidas em "contigs" utilizando os programas phred e phrap. Posteriormente, uma árvore filogenética foi construída com o coeficiente de Neighbour Joining e análise de "bootstrap" com 2.000 repetições.

Resultados e Discussão

Análise filogenética das seqüências do gene ribossomal 16S RNAr

A árvore filogenética resultante, após a análise das seqüências do 16S RNAr, dividiu as estirpes em dois grupos principais. Esses grupos foram relacionados aos gêneros/espécies de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*.

Assim como reportado por Menna et al. (2006), foi possível observar alguns agrupamentos distintos, com estirpes apresentando discrepância de até 1% nas seqüências nucleotídicas em relação às estirpes-tipo, sugerindo que essas podem estar relacionadas a novas espécies e, desse modo, foram classificadas como "sp."

Os resultados demonstraram, também, uma elevada promiscuidade quanto à planta hospedeira, com estirpes estabelecendo simbiose com leguminosas pertencentes a distintas tribos e até mesmo a distintas subfamílias, mas não foi possível observar uma correlação evolucionária entre as estirpes e suas respectivas plantas hospedeiras.

Análise filogenética dos genes *nodYA* ou *nodKA*

A presença dos genes *nodY* ou *nodK*, precedendo o operon *nodABC*, é exclusiva do gênero *Bradyrhizobium*. Estudos têm demonstrado que, devido à baixa homologia existente entre as seqüências dos genes *nodY* e *nodK*, aproximadamente 30%, esses podem ser utilizados para a distinção entre *B. japonicum* e *B. elkanii* (Doberet et al., 1994). Em nosso estudo, a análise das seqüências dos genes *nodYA* de *Bradyrhizobium japonicum* e *nodKA* de *B. elkanii*, revelou uma elevada diversidade genética e dividiu as estirpes em três grupos principais. O grupo I reuniu a maioria das SEMIAs analisadas e a estirpe de referência *B. japonicum* (USDA110). Todas as estirpes pertencentes a esse grupo foram relacionadas, com base na análise do 16S RNAr, à espécie de *B. japonicum* ou *Bradyrhizobium* sp. O grupo II reuniu 25 SEMIAs e a estirpe de referência *B. elkanii* (USDA94). Com base na análise do gene 16S RNAr, as estirpes pertencentes a esse grupo foram classificadas como *B. elkanii* ou *Bradyrhizobium* sp.

Com base nas seqüências do 16S RNAr, o grupo III reuniu as estirpes classificadas como *B. elkanii*, no entanto, as seqüências obtidas, após a amplificação com os "primers" descritos por Stener e Parker (1999), não apresentaram similaridade aos genes *nodKA* de *B. elkanii*, ou mesmo a *nodYA* de *B. japonicum*. Dados similares foram observados por You et al. (2002), os quais analisando estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes espécies de *Crotalaria* e *Vigna*, utilizando a técnica de hibridização, observaram a formação de um agrupamento distinto, formado por estirpes incapazes de nodular soja e siratro. Assim como relatado em nosso traba-

lho, essas estirpes diferiram, significativamente, das seqüências obtidas previamente para os genes *nodY* ou *nodK*, fato que levou os autores a sugerirem a presença de um novo gene precedendo os genes *nodABC*.

Não foi possível observar correlação entre a planta hospedeira e os agrupamentos formados, no entanto, todas as estirpes pertencentes ao grupo III são simbiotes de leguminosas não relacionadas à soja, sugerindo que, assim como relatado por You et al. (2002), a presença dos genes *nodY* ou *nodK* pode estar relacionada à especificidade à soja.

Considerações Finais

Os resultados obtidos demonstraram elevada diversidade genética entre as estirpes de *Bradyrhizobium* simbiotes de distintas leguminosas principalmente quanto aos genes de nodulação *nodY/KA*. Muitos pesquisadores concluem que há uma diversidade genética elevada entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e, desse modo, não deveriam ser nem mesmo agrupadas em um único gênero.

Surge então, uma grande necessidade de caracterizar essas estirpes de forma apropriada, a fim de identificar novas espécies, bem como genes determinantes da especificidade hospedeira e da eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio.

Referências

DOBERT, R. C.; BREIL, B. T.; TRIPLETT, E. W. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulation bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 5, 564-572, 1994.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiology Review**, 58, 501-505, 1994.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobial: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, 29, 819-830, 1997.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29, 315-332, 2006.

STERNER, J. P.; PARKER, M. A. Diversity and relationships of bradyrhizobia form *Amphicarpaeae bracteata* based on partial *nod* and ribossomal sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, 22, 387-392, 1999.

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

YOU, Z.; MARUTANI, M.; BORTHAKUR, D. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. **Journal of Applied Microbiology**, 93, 577-584, 2002.