

## **Transferência horizontal de genes simbióticos de estirpes inoculantes de *B. japonicum* para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados**

---

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 ProDoc Capes; <sup>2</sup>Bolsista de Doutorado do CNPq; <sup>3</sup>Bolsista de Doutorado da CAPES; <sup>4</sup>Embrapa Soja.

### **Introdução**

Com o seqüenciamento de vários genomas bacterianos tem sido identificada uma alta porcentagem de genes resultantes de eventos de transferência horizontal de genes ("horizontal gene transfer", HGT), o que tem gerado amplas discussões sobre conceitos básicos em relação à evolução e especiação em bactérias (Gogarten & Townsend, 2005). A identificação da ocorrência de transferência horizontal de genes entre bactérias em ambientes naturais tem possibilitado um melhor entendimento dos mecanismos de evolução, adaptação e ocupação de novos nichos ecológicos.

Acumulam-se, também, evidências de que a HGT entre diferentes espécies de bactérias pode ocorrer em todas as categorias funcionais de genes, inclusive os ribossomais, considerados como altamente conservados e utilizados, hoje, como a principal ferramenta da taxonomia. Com isso, um quadro com espécies bem definidas de procariotos parece cada vez mais distante, ocorrendo a sobreposição generalizada de várias regiões genômicas entre espécies distintas (Gogarten & Townsend, 2005).

Não há praticamente informação sobre eventos de HGT entre bactérias nos solos brasileiros. Uma situação comum e com alta probabilidade de HGT pode residir nos processos de introdução e estabelecimento, no solo, de populações de estirpes exógenas de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* pela inoculação de sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.). Atualmente,

populações de estirpes inoculantes estão estabelecidas em grande parte do território nacional, em cerca de 22 milhões de hectares e têm sido estimadas em  $10^2$  a  $10^6$  células viáveis  $g^{-1}$  de solo. Torna-se fundamental, portanto, identificar eventos de HGT entre as estirpes exógenas e as populações nativas de rizóbios do solo. Neste trabalho são mostradas evidências de HGT em solos dos Cerrados, com a descrição de duas estirpes nativas de rizóbios contendo genes simbióticos de estirpes de *B. japonicum* utilizadas como inoculantes.

## Objetivos

Caracterizar genotipicamente estirpes de rizóbios, isoladas a partir de nódulos de soja, com o objetivo de identificar a ocorrência da transferência horizontal de genes simbióticos a partir de estirpes utilizadas nos inoculantes para estirpes de rizóbios nativas dos solos dos Cerrados.

## Material e Métodos

As estirpes de rizóbios utilizadas estão descritas na Tabela 1. As estirpes foram isoladas a partir de nódulos de soja em Planaltina, DF, de uma área cultivada com essa leguminosa há 15 anos. A área era, originalmente, ausente de rizóbios capazes de se associar simbioticamente com a soja e recebeu inoculantes contendo exclusivamente as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 566 ou SEMIA 586 (Boddey & Hungria, 1997; Santos et al., 1999).

Inicialmente, as estirpes foram avaliadas quanto à eficiência do processo de fixação biológica do  $N_2$ , em experimento conduzido em substrato estéril e condições controladas de casa-de-vegetação, em blocos ao acaso, com três repetições. Foram determinados os parâmetros de nodulação (número e massa de nódulos), crescimento das plantas (massa da parte aérea) e capacidade de fixação do  $N_2$  (N total acumulado na parte aérea), segundo Santos et al. (1999). Os dados foram submetidos à análise estatística (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Para as avaliações morfológicas (morfologia das colônias) e fisiológicas (taxa de crescimento e reação alcalina ou ácida *in vitro*), as

**Tabela 1.** Estirpes de rizóbios analisadas.

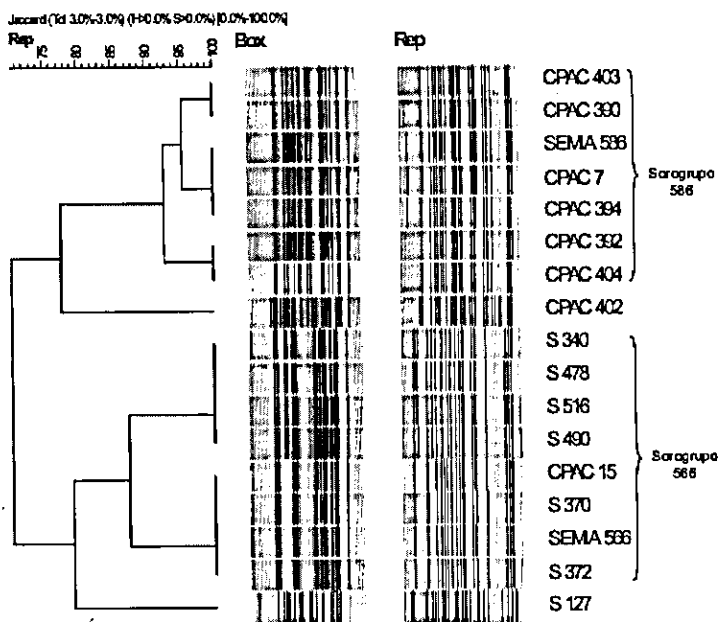
Estirpes	Sorogrupo	Observações
SEMIA 566	566	Isolada de inoculante norte-americano em 1966.
CPAC 15 (=SEMIA 5079)	566	Variante natural da SEMIA 566 adaptada aos solos de Cerrados e com maior capacidade de fixação de N <sub>2</sub> do que a parental.
S 127, S 340, S 370, S 372, S 478, S 490, S 516	566	Variantes naturais da SEMIA 566, obtidas pelo mesmo processo de seleção da CPAC 15.
SEMIA 586	586	Estirpe recebida da Austrália em 1966.
CPAC 7 (=SEMIA 5080)	586	Variante natural da SEMIA 586, adaptada aos solos dos Cerrados e com maior capacidade competitiva do que a parental.
CPAC 390, CPAC 392, CPAC 394, CPAC 402, CPAC 403, CPAC 404	586	Variantes naturais da CPAC 7, obtidas pelo mesmo processo de seleção da CPAC 7.

estirpes foram crescidas por sete dias em meio com extrato de levedura e manitol contendo vermelho Congo ou azul de bromofenol. A caracterização genética das estirpes foi realizada pela metodologia de *rep*-PCR ("polymerase chain reaction"), pela amplificação do DNA das bactérias com "primers" (REP e BOX-A1R) que reconhecem regiões repetitivas e conservadas do DNA, normalmente intergênicas, segundo as metodologias descritas por Santos et al. (1999) e Versalovic et al. (1994), respectivamente. O gene ribossomal 16S foi amplificado e caracterizado por PCR-RFLP ("restriction fragment length polymorphism") e seqüenciamento, conforme descrito por Germano et al. (2006) e Menna et al. (2006), respectivamente. Os genes *nodY*, *nodA*, *nodC* e *nifH* foram analisados comparativamente quanto aos perfis de PCR-RFLP e pelas seqüências nucleotídicas, segundo Laguerre et al. (2001).

## Resultados e Discussão

Os resultados das avaliações da eficiência na fixação biológica do  $N_2$  demonstraram que a maioria das estirpes variantes naturais da SEMIA 566 apresentou valores superiores em todos os parâmetros avaliados, em relação à estirpe parental, o que não ocorreu com as variantes da estirpe SEMIA 586, uma vez que essas foram selecionadas para maior competitividade (dados não apresentados).

As 17 estirpes foram comparadas por *rep*-PCR e os resultados são apresentados na Figura 1. Com exceção da CPAC 402 e da S 127, as estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo foram agrupadas com um nível de similaridade superior a 85%, indicando um grau elevado de relação genética dentro de cada sorogrupo. Além disso, a S 127 apresentou características típicas de *Bradyrhizobium in vitro*, enquanto a CPAC 402 acidificou o meio



**Figura 1.** Agrupamento das estirpes de rizóbios com base nos marcadores BOX A1R e REP, utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

e apresentou grande produção de muco. A CPAC 402 e a S 127 também apresentaram perfis bastante distintos na análise de PCR-RFLP do 16S rDNA (dados não apresentados), indicando que essas estirpes não pertencem à espécie *B. japonicum*.

Pelo seqüenciamento total dos genes 16S rRNA, foi possível identificar que a S 127 apresenta similaridade de bases com a espécie *B. elkanii*, enquanto a CPAC 402 com *Sinorhizobium fredii*. O seqüenciamento dos genes simbióticos relacionados à nodulação (*nod*) e fixação do  $N_2$  (*nif*), *nodY*, *nodA*, *nodC* e *nifH* das estirpes S 127 e CPAC 402 foi realizado, buscando informações sobre possíveis transferências laterais de genes. A estirpe S 127 de *B. elkanii* apresenta o gene *nodC* originário de *B. japonicum*, enquanto os demais genes analisados são endógenos da própria espécie. Os genes *nod* da CPAC 402 de *S. fredii* são originários de *B. japonicum*, mas foram identificadas duas cópias do gene *nifH*, uma endógena de *S. fredii* e outra originária de *B. japonicum*.

## Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que genes simbióticos foram, provavelmente, transferidos horizontalmente das estirpes inoculantes de *B. japonicum*, dos sorogrupos SEMIA 566 e SEMIA 586, para duas outras espécies de rizóbios nativos dos solos dos Cerrados, *Sinorhizobium fredii* e *Bradyrhizobium elkanii*. O entendimento dos mecanismos de HGT e seu efeito na simbiose com a cultura da soja é essencial para a busca de novas estratégias para a obtenção de estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas.

## Referências

- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 407-415, 1997.
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains

from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

GOGARTEN, J. P.; TOWNSEND, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature Reviews**, v. 3, p. 679-687, 2005.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, p. 981-993, 2001.

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

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

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**, v. 5, p. 25-40, 1994.