



Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR

Mariangela Hungria¹
Ligia Maria O. Chueire²
Pâmela Menna³
Eliane Villamil Bangel⁴

Introdução

O processo de fixação biológica do N_2 é essencial para a viabilidade econômica do agronegócio brasileiro e o exemplo mais evidente é o da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pois estima-se que, considerando-se a área sob o cultivo com essa leguminosa no País, o rendimento da cultura e o preço dos fertilizantes nitrogenados, haja uma economia anual (estimativa em 2007) de US\$ 6,6 bilhões, que deixam de ser gastos com fertilizantes nitrogenados (Hungria et al., 2007). Em adição a outros exemplos de sucesso, por exemplo, com a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (Hungria et al., 2000, 2003), pode-se concluir que, hoje, o Brasil é líder mundial em aproveitamento dos benefícios resultantes do processo de fixação biológica do N_2 (Hungria et al., 2007). Esse panorama favorável resulta de décadas de esforços da pesquisa brasileira, com ênfase na seleção de estirpes de bactérias diazotróficas (isto é, capazes de fixar N_2) simbióticas de leguminosas e adaptadas às cultivares e condições edafo-climáticas do Brasil.

No primeiro fórum realizado para definir inoculan-

tes e tecnologias de inoculação— a RELARE, Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de Rhizobium— realizado em 1985, ressaltou-se como marco histórico a discussão e definição dos mecanismos de recomendação de estirpes para o uso em inoculantes brasileiros (RELARE, 1985). Décadas de pesquisa resultaram em que, hoje, a coleção SEMIA (“Rhizobium Culture Collection” da Seção de Microbiologia Agrícola; Catálogo do IBP de Coleções de Rhizobium n.º. 443 na WFCC World Data Center on Microorganisms), fiel depositária das estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil, disponha de 142 estirpes indicadas para 96 leguminosas hospedeiras. Essas estirpes, reconhecidas como as mais eficientes para as respectivas plantas hospedeiras, representam um reservatório valioso de bactérias e genes de grande valor biotecnológico. Contudo, a caracterização genética dessas estirpes era incipiente, dificultando um controle genético altamente confiável, tanto da coleção de culturas, como do material distribuído às indústrias de inoculantes (Hungria & Campo, 2007; Menna et al., 2008).

Pela definição atual de taxonomia, a sequência completa do gene 16S rRNA consegue definir a

¹Eng^a Agrônoma, Doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Soja, Cx. Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, PR, hungria@cnpso.embrapa.br; ²Bioquímica, Embrapa Soja, ligia@cnpso.embrapa.br; ³Bolsista, pós-doutorado CNPq, pamela_menna@yahoo.com.br; ⁴Médica veterinária, mestre em Microbiologia agrícola e do ambiente, FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias 579, 90130-060, Porto Alegre, RS, eliane-bangel@fepagro.rs.gov.br

posição das bactérias em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie (Garrity & Holl, 2001). Desse modo, os genes 16S rRNA devem ser utilizados, preferencialmente, em estudos de taxonomia e filogenia, havendo um esforço em depositar um grande número dessas sequências, por exemplo, no "Ribosomal Database Project" (<http://rdp.cme.msu.edu/>); além disso, o depósito de sequências referentes a outros genes ribossomais tem incrementado. Nesse contexto, também estão sendo alocados esforços no sequenciamento do gene 16S rRNA e outros genes ribossomais das estirpes depositadas na coleção SEMIA e na "Coleção de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas" da Embrapa Soja (Menna et al., 2006; Binde, 2008; Menna-Pereira, 2008). Contudo, como a análise de genes ribossomais não consegue diferenciar estirpes, outros métodos genéticos devem ser utilizados para o controle de qualidade das bactérias, tanto na rotina de manutenção das coleções de culturas, como na etapa de distribuição para as indústrias de inoculantes.

Um método internacionalmente reconhecido de caracterização de estirpes consiste na determinação do perfil de DNA após a amplificação com *primers* (oligonucleotídeos) relacionados a regiões repetitivas e conservadas do DNA, em geral no espaço intergênico, a avaliação por rep-PCR (repetitive-sequence-based-PCR) (Versalovic et al., 1991, 1994; de Bruijn, 1992). Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Existem três famílias principais de elementos, incluindo as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (35-40 pb) (Stern et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (124-127 pb) (Hulton et al., 1991) e BOX—box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb) (Martin et al., 1992); neste último caso, apesar da existência de três elementos, somente a subunidade boxA parece ser altamente conservada em bactérias (Koeuth et al., 1995). Supõe-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismo, essas regiões gênicas tenham uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos microrganismos com ambientes hostis (van Berkum, 1999). Os *primers* para a amplificação desses elementos podem ser sintetizados a partir de repetições invertidas dos elementos REP, ERIC e da subunidade box A do BOX e, se as repetições estiverem distribuídas no genoma em orientação invertida, então um único *primer* pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (Versalovic et al., 1991, 1994; Rademaker et al., 1998).

Os elementos BOX foram, inicialmente, identificados em microrganismos Gram-positivos (*Streptococcus pneumoniae*) (Martin et al., 1992), mas logo também provaram utilidade para a tipagem de espécies Gram-negativas (Koeuth et al., 1995). A primeira publicação do grupo de pesquisa da Embrapa Soja com rep-PCR data de 1998 (Hungria et al., 1998) e, nos dez anos seguintes, quase 30 trabalhos publicados por este grupo de pesquisa comprovaram discriminação elevada, facilidade na análise e repetibilidade na obtenção dos perfis de bactérias diazotróficas por rep-PCR. Desse modo, perfis característicos de centenas de estirpes de rizóbios, inclusive aquelas autorizadas para a produção de inoculantes comerciais foram obtidos utilizando REP- e/ou ERIC-PCR (Hungria et al., 1998; Santos et al., 1999; Chen et al., 2000; Chueire et al., 2000; Hungria et al., 2000; Ferreira & Hungria, 2002; Mostasso et al., 2002; Grange & Hungria, 2004; Hungria et al., 2006; Barcellos et al., 2007; Pinto et al., 2007), e BOX-PCR (Fernandes et al., 2003; Galli-Terasawa et al., 2003; Alberton et al., 2006; Kaschuk et al., 2006a,b; Barcellos et al., 2007; Batista et al., 2007; Loureiro et al., 2007; Pereira et al., 2007; Pinto et al., 2007; Menna et al., 2008; Stocco et al., 2008). Além disso, a análise por rep-PCR também se mostrou altamente eficiente para a obtenção de perfis de bactérias diazotróficas endofíticas ou associativas (Albino et al., 2006; Torres et al., 2008), bem como de outras espécies de bactérias representantes da biodiversidade brasileira e com grande potencial biotecnológico, como é o caso de *Chromobacterium violaceum* (Hungria et al., 2005). Atualmente, mais de 2.000 estirpes da coleção de culturas da Embrapa Soja estão caracterizadas por rep-PCR, com a informação de centenas delas disponibilizadas na homepage da "Brazilian Microbial Resource Center-BMRC", no endereço <http://www.bmrc.Incc.br>. Uma análise detalhada dos resultados obtidos indicou que a análise por BOX-PCR resulta em perfis com maior número de bandas e menor custo na análise, por requerer um único *primer*, resultando na sugestão de adoção desses perfis para o controle de qualidade de coleções de culturas de rizóbios, bem como para a distribuição das estirpes para as indústrias de inoculantes (Hungria et al., 2008; Menna et al., 2009).

Desse modo, visando uniformizar a metodologia de BOX-PCR, o que permitirá a comparação dos perfis de bactérias nos diversos laboratórios de pesquisa no Brasil, a metodologia detalhada é descrita neste comunicado.

2. Metodologia

2.1. Extração do DNA

As análises para a obtenção dos perfis de BOX-PCR são realizadas, preferencialmente, com o DNA das bactérias, havendo vários métodos de extração de DNA. As análises também podem ser feitas diretamente, utilizando-se colônias puras ou meio líquido, contudo, os estudos de otimização e validação conduzidos na Embrapa Soja indicam que a utilização de DNA extraído e purificado resulta em melhor qualidade e repetibilidade dos resultados. As bactérias podem ser colocadas para crescer em meio "extrato de levedura-manitol" (YM, yeast-mannitol, também conhecido como Meio 79 e contendo, em 1 litro: 10,0 g de manitol; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,4 g de extrato de levedura, completado com água destilada e com pH ajustado a 6,8) (Vincent, 1970), mas modificado para conter 5,0 g.L⁻¹ de manitol, visando diminuir a produção de exopolissacarídeos. As bactérias também podem ser colocadas em outros meios que se mostrem adequados para o seu crescimento, por exemplo, o meio "triptona-extrato de levedura" (TY, tryptone-yeast, contendo, em 1 litro: 5,0 g de triptona; 3,0 g de extrato de levedura; $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,87 g; completado com água deionizada e pH ajustado a 6,8 a 7,2) (Somasegaran & Hoben, 1994), útil no caso de bactérias apresentando grande produção de exopolissacarídeos.

Para a extração do DNA das bactérias, recomenda-se que as mesmas sejam colocadas para crescer em 15 a 20 mL do meio YM por 3 a 10 dias, dependendo da taxa de crescimento, que pode ser de rápida (3 dias), a extra-lenta (10 dias), com agitação a 150 a 200 rpm, em temperatura de, aproximadamente, 28°C, com incubação no escuro. Todas as soluções utilizadas para a extração do DNA devem ser previamente autoclavadas. Após a incubação, centrifugar as suspensões bacterianas a, aproximadamente, 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e descartar o sobrenadante. Em seguida, ressuspender o pélete e lavar por três vezes, com 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) podendo, ainda, no caso de bactérias com grande produção de exopolissacarídeos, fazer uma última lavagem com solução salina tamponada de fosfato (PBS 1 X, contendo, em 500 mL: 4,383 g de NaCl 150 mmol.L⁻¹; 0,1793 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 2,6 mmol.L⁻¹; 1,36 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7,6 mmol.L⁻¹). Centrifugar e descartar o sobrenadante.

Depois da última lavagem, acrescentar 1 mL de solução salina ou PBS, homogeneizar e transferir o pélete para um tubo de ensaio de vidro ou outro recipiente. Ajustar a concentração de células a, aproximadamente, 10^9 células.mL⁻¹, pela adição de solução salina e calibração, que pode ser efetuada utilizando diferentes métodos, incluindo leitura da densidade ótica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 a 540 nm (caso a curva de crescimento da bactéria já tenha sido determinada), ou por leitura em câmaras de crescimento Petroff-Hausser ou Helber (Somasegaran & Hobem, 1994) ou, ainda, visualmente, utilizando padrões de soluções de McFarland de sulfato de bário (Somasegaran & Hobem, 1994). Transferir aproximadamente 1,4 a 1,5 mL para um outro tubo de PCR de 1,7 ou 2 mL de capacidade (no tubo de 1,7 mL a visualização do pélete é mais fácil), centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente (sempre que se referir a temperatura ambiente, neste protocolo, ela será de 21 a 23°C) e descartar o sobrenadante. Em seguida, ressuspender o precipitado em 400 µL de TE 50:20 (50 mmol.L⁻¹ de Tris, pH 8; 20 mmol.L⁻¹ de EDTA- Na_2 pH 8), adicionar 50 µL de SDS a 10% (10 g de dodecil sulfato de sódio em 100 mL de água), 10 µL de proteinase K (10 mg.mL⁻¹, mantida no congelador), 10 µL de lisozima (5 mg.mL⁻¹, mantida no congelador), 2 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹, mantida conforme especificação do fabricante) e, então, incubar a 37°C por, aproximadamente, 1 hora (ou até que o material se torne mais claro). Na sequência, as amostras podem ser homogenizadas com ponteiras de 1 mL com a ponta cortada (aspirar e soltar o material bem lentamente), por três vezes, para retirar a viscosidade. A seguir, acrescentar 30 µL de NaCl 5 mol.L⁻¹ (resultando em uma concentração final de 250 mmol.L⁻¹), 70 µL de AcO-Na 3 mol.L⁻¹ (concentração final de 300 mmol.L⁻¹) e 28 µL de H₂O Milli-Q. As amostras devem ser bem homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora na geladeira (aproximadamente 8°C) e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Recolher 300 µL do sobrenadante de cada amostra e adicionar 600 µL (ou 2 volumes, no caso de menor volume de sobrenadante) de etanol puro (95 a 99%) gelado (aproximadamente -20°C) armazenando-se, então, por uma noite, a -20°C. No dia seguinte, centrifugar as amostras a 12.000 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente, descartar o etanol e adicionar 400 µL a 1 mL de etanol a 70% (temperatura ambiente), visando lavar bem o pélete e retirar o excesso de sais. Centrifugar nova-

mente a 12.000 rpm durante 5 minutos, em temperatura ambiente, descartar o etanol e secar os precipitados, também em temperatura ambiente por, aproximadamente, 3 horas. Ressuspender os precipitados em 50 μL de água Milli-Q ou TE 10:1 (10 mmol.L^{-1} Tris-HCl pH 8; 1 mmol.L^{-1} EDTA, pH 8,0), ambos previamente esterilizados. As amostras podem ser armazenadas a -20°C , mas a qualidade do DNA sempre deve ser verificada antes de cada análise.

2.2. Verificação da qualidade do DNA

Para confirmar a concentração e pureza do DNA, as amostras podem ser submetidas à eletroforese em mini-gel de agarose de 10 x 11 cm a 1,0% [0,4 g de agarose em 40 mL de TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA, 0,5 M, ajustado em pH 8, para cada litro de solução)]. Aplicar a amostra, utilizando 2 μL da amostra, adicionados a 2 μL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol). Submeter à eletroforese durante 40 minutos a 80 Volts. Como essa é apenas uma etapa de verificação, outros tamanhos de géis, bem como o tempo e a voltagem podem ser alterados. A concentração do DNA pode ser verificada por comparação com padrões de peso molecular conhecidos, por exemplo, LambdaTM (InvitrogenTM) ou Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM), ou outro padrão similar. A pureza do DNA deve ser verificada após a coloração com brometo de etídio (40 μL do estoque a 1% em 800 mL de água) e visualização em um transluminador sob radiação ultravioleta de comprimento de onda curto, ou pelo uso de outro corante que tenha a mesma finalidade, adequando os filtros e comprimentos de onda para esse corante. Equipamentos de quantificação de DNA também podem ser utilizados. A pureza do DNA pode ser verificada, no gel, pela verificação de uma única banda de DNA, sem qualquer tipo de arraste; no caso de leitura em espectrofotômetro, a relação das leituras nos comprimentos de onda 260/280 nm deve ficar entre 1,8 e 2,0. A concentração do DNA deve ser ajustada para a concentração desejada, recomendando-se 50 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$, usando água Milli-Q esterilizada como diluente.

2.3. Reação de BOX-PCR

Para a amplificação do DNA, utiliza-se o *primer* BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994; Koeuth et al., 1995), com as reações de amplificação efetuadas conforme as modificações especificadas por Fernandes

et al. (2003) e Kaschuk et al. (2006). Visando a uniformização para a obtenção de perfis idênticos, a reação de amplificação deverá ser conduzida em um volume final de 25 μL , contendo: água Milli-Q estéril, 13,8 μL ; dNTPs, 5,0 μL (estoque com 1,5 mmol.L^{-1} de cada base); tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 2,5 μL ; MgCl_2 , 1,5 μL (50 mmol.L^{-1}); *primer*, 1,0 μL (50 $\text{pmol.}\mu\text{L}^{-1}$); DNA, 1,0 μL (50 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$); Taq, 0,2 μL (5 $\text{U.}\mu\text{L}^{-1}$). As concentrações podem ser ajustadas no caso de reagentes com concentrações distintas.

A amplificação será realizada usando-se os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 40°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C . Para DNA extraído, 30 ciclos são suficientes, enquanto que, para células ou colônias, recomendam-se 35 ciclos (Versalovic et al., 1994).

Depois da amplificação, adicionar, aos 25 μL de cada reação, 5 μL de tampão (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol). Preparar um gel de agarose (low EEO, type I-A) a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA Na_2 0,5 M; pH 8,0 em 1 L de água destilada). Adicionar 250 mL da solução a uma bandeja de cuba de eletroforese de, aproximadamente, 20 x 25 cm. Nas canaletas do gel, colocar 30 μL de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e, preferencialmente, também da central, nas quais devem ser colocados 5 μL de padrão, por exemplo, do padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA LadderTM (InvitrogenTM), ou outro padrão similar. Para preparar o padrão de 1 kb plus DNA LadderTM, para cada 1 μL do marcador, adicionar 2 μL de tampão de amostra e 7 μL de água Milli-Q; desse modo, a aplicação de 5 μL corresponde a 0,5 μg de padrão. Também incluir sempre tubos controle, contendo os reagentes, mas sem DNA, para verificar possíveis contaminações. Aplicar a voltagem de 120 Volts (aproximadamente 5 Volts.cm^{-1}) e correr à temperatura ambiente por, aproximadamente, 6:30 h (entre 6 e 7 h), até que falem cerca 2 cm para o final do gel. O tamanho e volume do gel e a voltagem devem ser rigorosamente seguidos. Corar o gel conforme descrito nesta metodologia para a verificação da qualidade do DNA, visualizar em transluminador e fotografar. Como padrão de comparação para as condições de amplificação e equipamentos de cada laboratório, recomenda-se utilizar, nas corridas, a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (= CPAC 15), cujo perfil de BOX-PCR pode ser visualizado na figura 3.

2.4. Estirpes apresentando perfis idênticos por BOX-PCR

No caso de estirpes apresentando o mesmo perfil de BOX-PCR, podem-se obter, em caso de necessidade de comprovação de identidade, os perfis de ERIC-PCR ou REP-PCR. Para a amplificação, utilizar-se-ão os pares de *primers* descritos por de Bruijn (1992) e Versalovic et al. (1991, 1994), REP 1R-REP 2I e ERIC 1R-ERIC 2:

| | |
|---------|------------------------------|
| REP 1R | 5'-IIICGICGICATCIGGC-3' |
| REP 2I | 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' |
| ERIC 1R | 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' |
| ERIC 2 | 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' |

A extração de DNA e verificação da pureza serão realizadas conforme descrito para BOX-PCR. Para a reação de amplificação, utilizar as mesmas concentrações recomendadas para BOX-PCR, exceto que, pela utilização de dois *primers*, adicionando 1 μL de cada um (50 pmol. μL^{-1}), o volume final de 25 μL levará 1 μL a menos de água Milli-Q estéril.

A reação de amplificação será realizada segundo de Bruijn (1992) e Versalovic et al. (1994), com as modificações efetuadas por Santos et al. (1999), resultando no ciclos descritos a seguir: REP 1R e REP 2I: 1 ciclo a 95°C por 7 min.; 30 a 35 ciclos a 94°C por 1 min., a 45°C por 1 min. e a 65°C por 8 min.; 1 ciclo final de extensão a 65°C por 16 min., mantendo-se, então, a 4°C. Para os *primers* ERIC 1R e ERIC 2, os ciclos serão de: 1 ciclo de 95°C por 7 min.; 30 a 35 ciclos a 94°C por 1 min, a 52°C por 1 min. e a 65°C por 8 min; 1 ciclo final de extensão a 68°C por 16 min., mantendo-se, então, a 4°C. A corrida em gel de eletroforese deverá ser realizada conforme descrito para BOX-PCR.

2.5. Perfis de DNA obtidos por BOX-PCR

Exemplos de resultados obtidos com diferentes estirpes, evidenciando o poder de discriminação da análise por BOX-PCR, a confiabilidade em diferenciar diferentes estirpes e a repetibilidade do método podem ser visualizados na figura 1. Também pode ser visualizada, na figura 2, uma análise de agrupamento com os produtos de BOX-PCR obtidos para 170 estirpes de rizóbios. Nesse segundo estudo (Menna-Pereira, 2008), as bandas foram analisadas pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6) e, para a análise de agrupamento, foi utilizado o al-

goritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean, Sneath & Sokal, 1973) e o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1912). Mais informações sobre as estirpes desse estudo podem ser obtidas na homepage da Brazilian Microbial Resource Center (<http://www.bmrc.lncc.br>). Finalmente, na figura 3 são fornecidos, para comparação em análises conduzidas em outros laboratórios, os perfis da estirpe SEMIA 5079 de *B. japonicum* obtidos por REP- e ERIC- e BOX-PCR. Recomenda-se que bandas de PM iguais ou superiores a 12.000 e inferiores a 300 pb não sejam consideradas, pois apresentam maior variabilidade e podem representar falsos produtos de PCR.

2.6. Conclusões

A comparação de várias metodologias de obtenção de perfis de DNA para a caracterização de estirpes, pela análise de mais de mais de 2.000 bactérias no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja permite a recomendação de obtenção de perfis de BOX-PCR para a utilização no controle de qualidade de coleções de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas, inclusive para a distribuição das estirpes para outros laboratórios e para as indústrias de inoculantes. A padronização da metodologia e sua adoção em diversos laboratórios permitirá a comparação dos materiais genéticos das coleções, bem como a rastreabilidade na distribuição e uso das estirpes.

Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente pelo CNPq (552393/2005-3); M. Hungria, L.M.O. Chueire e P. Menna são também bolsistas do CNPq.

Referências

- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology & Biochemistry*, v.38, p.1298-1307, 2006.
- ALBINO, U.; SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant and Soil*, v.287, n.2, p.199-207, 2006.

- BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2635-2643, 2007.
- BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; FERREIRA, M.C.; MENDES, I.C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v.53, p.270-284, 2007.
- BINDE, D.R. **Análise filogenética, com base no gene ribossomal 16S, de 54 estirpes elite de rizóbios utilizadas em inoculantes comerciais brasileiros**. 2008. 53f. (Mestrado em Biotecnologia) – Depto. de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5099-5103, 2000.
- 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**, v.4, p.80-95, 2000.
- 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**, v.58, p.2180-2187, 1992.
- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes para as culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.911-920, 2003.
- FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p.139-152, 2002.
- GALLI-TERASAWA, L.V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, n.9, p.933-939, 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.ed. New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2001. p.119-154.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia in two Brazilian ecosystem. **Soil Biology Biochemistry**, v.36, n.9, p.1389-1398, 2004.
- HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-762, 1991.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; LABANDERA, C.; SANJUAN, J. (Ed.). **Biofertilizantes en Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial**. Montevideo: Cytod/Biofag, 2007. p.22-31.
- 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**, v.32, p.1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; ASTOLFO-FILHO, S.; CHUEIRE, L.M.O.; NICOLÁS, M.F.; SANTOS, E.B.P.; BULBOL, M.R.; SOUZA-FILHO, A.; NOGUEIRA ASSUNÇÃO, E.; GERMANO, M.G.; VASCONCELOS, A.T.R. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p.17-23, 2005.

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**, v.27, n.4, p.393-399, 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

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

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F.J.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v.288, p.343-356, 2006.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14., Bonito, 2008. **Programa e resumos...** s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. p.12.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v.11, p.37-50, 1912.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under the no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, n.2, p.210-220, 2006a.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J.C.P.; BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil &**

Tillage Research, v.87, n.2, p.205-217, 2006b.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, p.408-418, 1995.

LOUREIRO, M.F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping and inoculation managements. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.665-674, 2007.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERY J.P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479-3483, 1992.

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. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, 2009. No prelo.

MENNA-PEREIRA, P. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA.** 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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.

- PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO, R.J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p.1397-1412, 2007.
- PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, n.8, p.1851-1864, 2007.
- RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; de BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.1-26.
- REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA A RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM*, 1., 2005. **Ata...** Disponível em: <<http://www.relare.org.br/rtfatas/1315a14b7a1998ea98d6cbf7ae07bfea.rtf>> . Acesso : em abr. 2006.
- SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.261-272, 1999.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia : methods in legume *Rhizobium* technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p.
- STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v.37, p.1015-1026, 1984.
- STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p.1107-1120, 2008.
- TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, n.4, p.373-379, 2008.
- VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, p.729-734, 1999.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, 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 Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

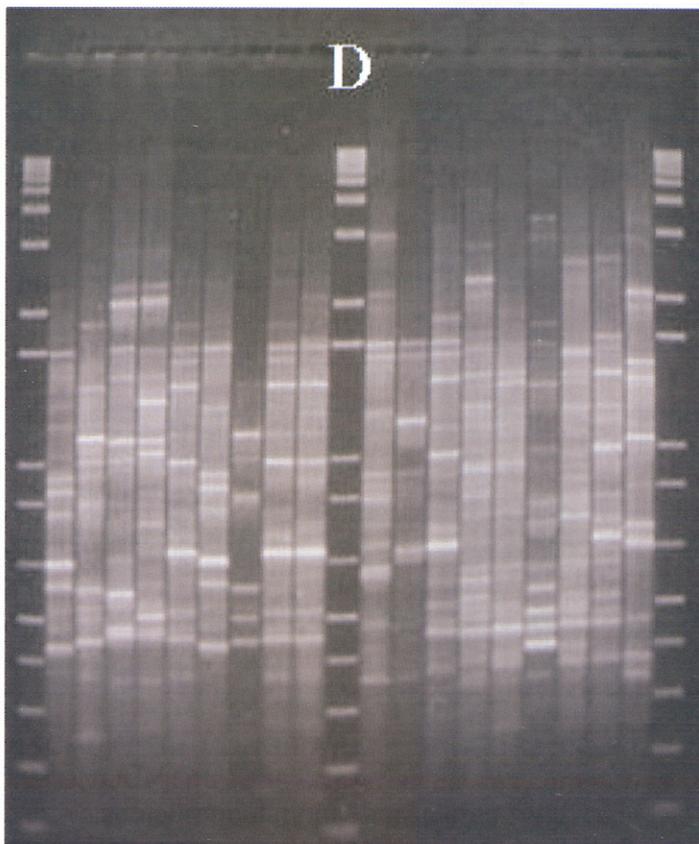
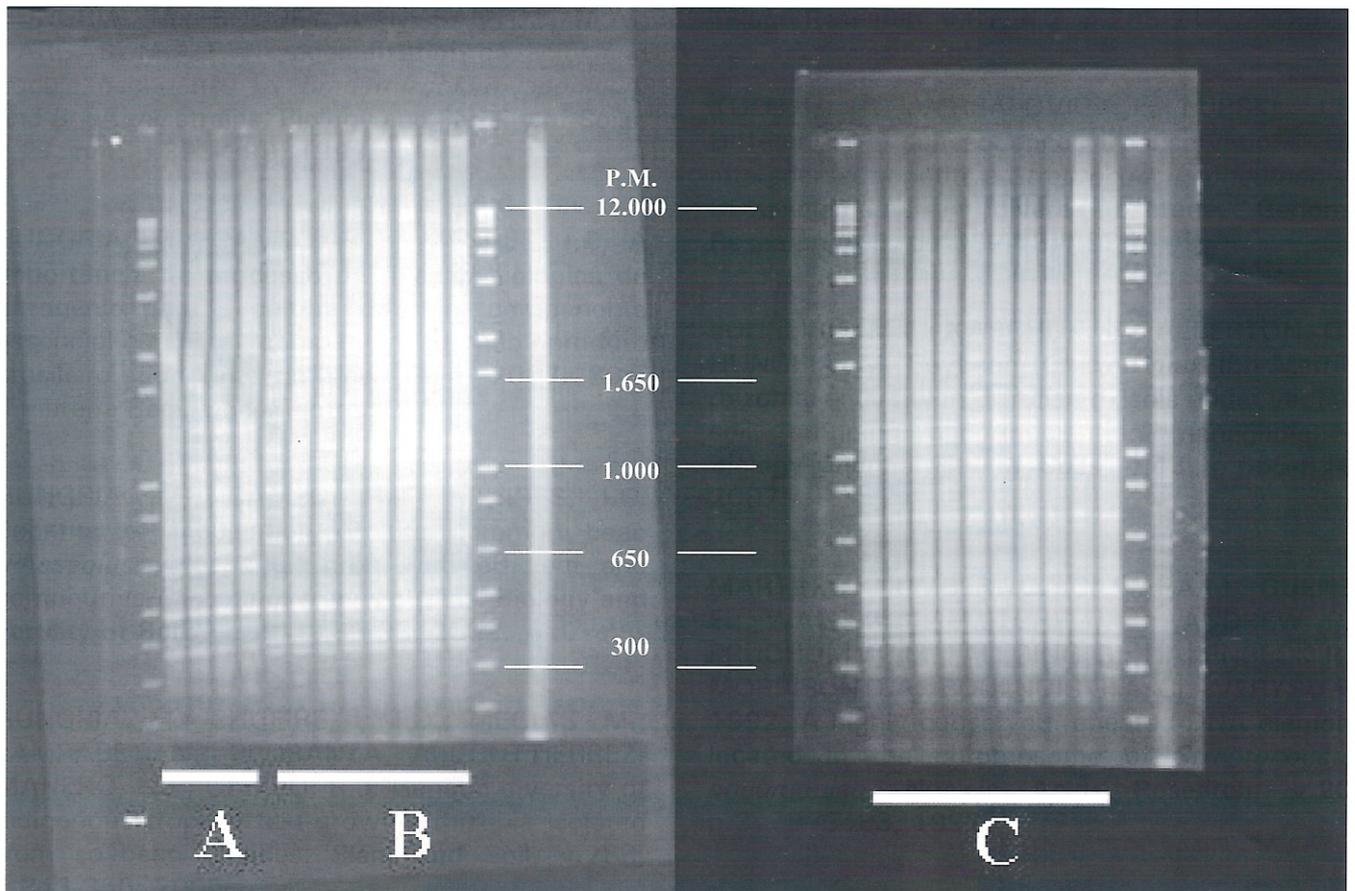
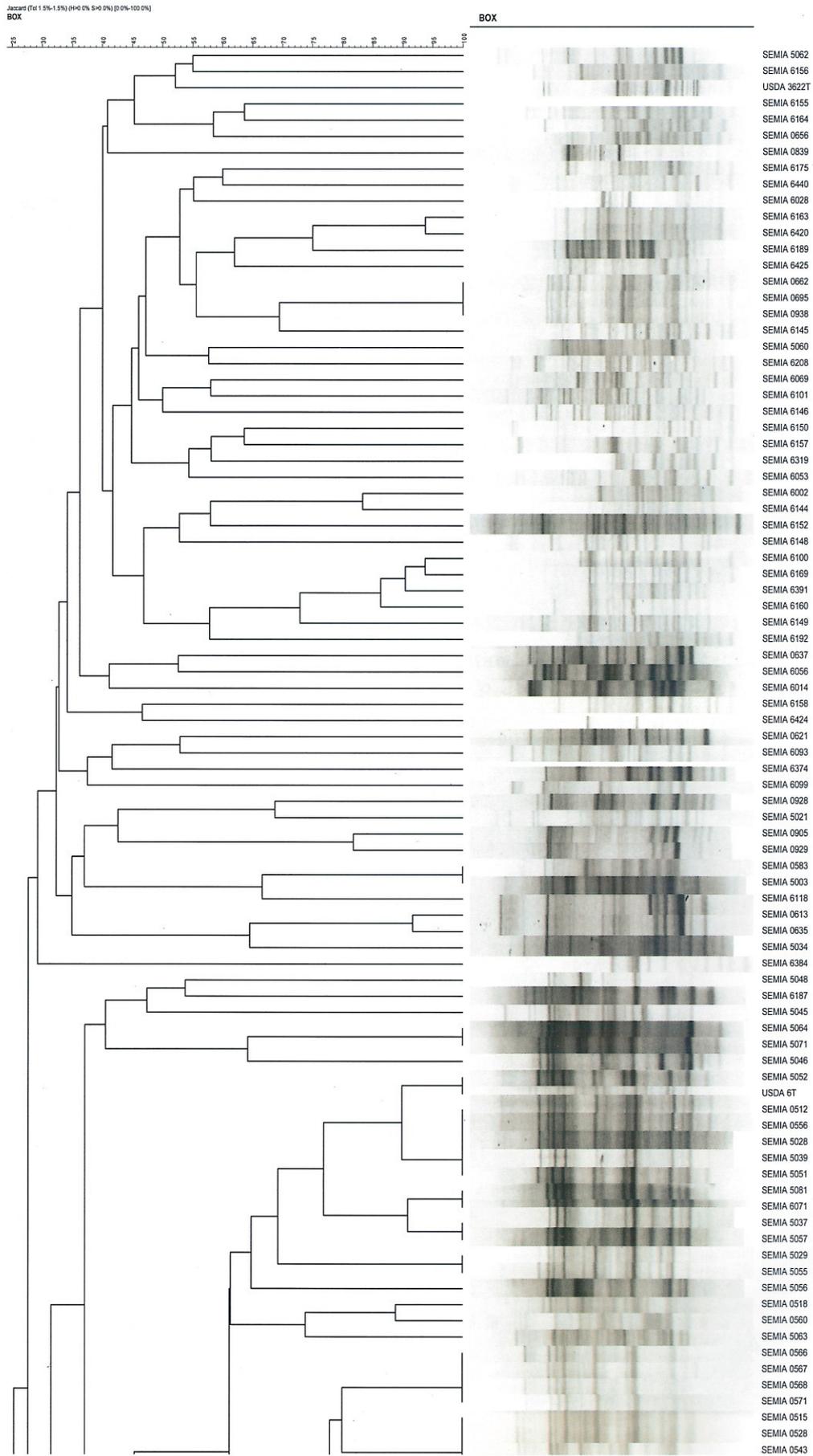


FIGURA 1. Perfis de BOX-PCR obtidos: (A, B) de duas estirpes, A e B, em que as reações de amplificação ocorreram a partir de uma única extração de DNA para cada bactéria, seguida pela amplificação do DNA, realizadas em dias distintos; (C) em repetições da mesma estirpe, com DNA da mesma estirpe; (D) indicando o potencial de detectar biodiversidade genética entre diversas estirpes.

Figura 2. Similaridade Genética (%)



Continuação... Figura 2. Similaridade Genética (%)

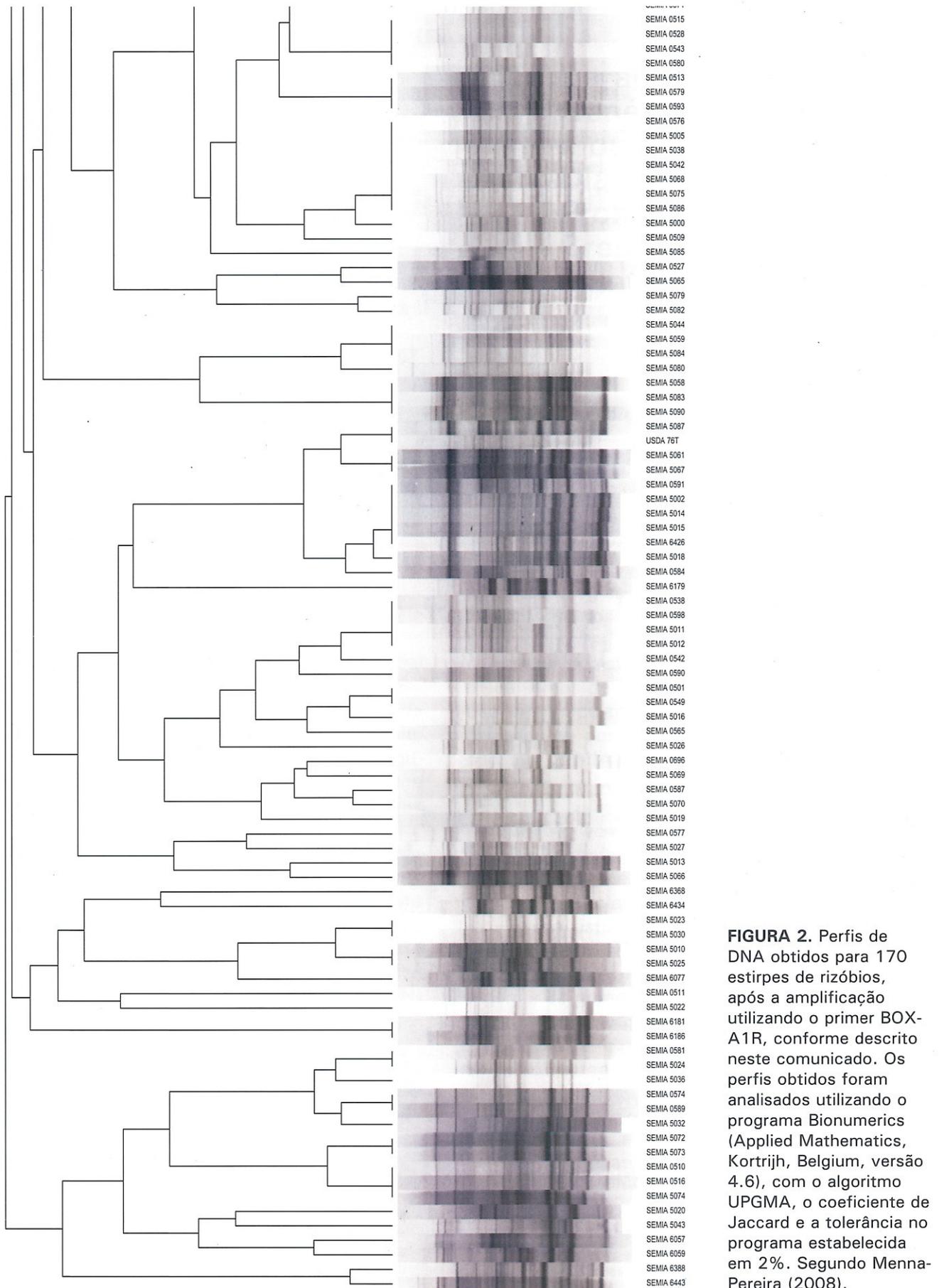


FIGURA 2. Perfis de DNA obtidos para 170 estirpes de rizóbios, após a amplificação utilizando o primer BOX-A1R, conforme descrito neste comunicado. Os perfis obtidos foram analisados utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, versão 4.6), com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e a tolerância no programa estabelecida em 2%. Segundo Menna-Pereira (2008).

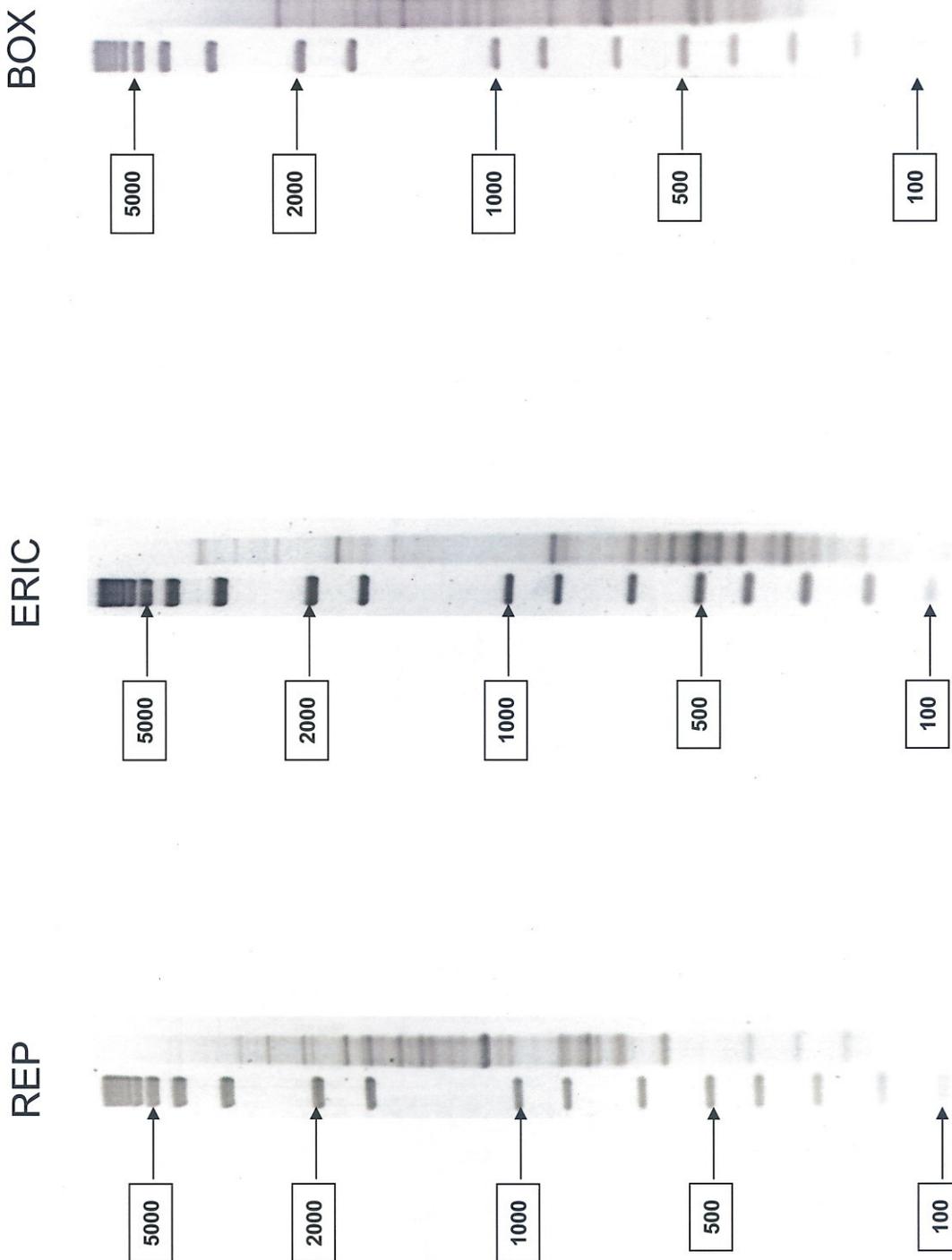


Figura 3. Perfis De REP-, ERIC- e BOX-PCR obtidos para estirpe SEMIA 5079de *Bradyrhizobium japonicum*.

Comunicado Técnico, 79

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Soja
Rod. Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral
Cx. Postal: 231
860001970 Londrina - PR



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Fone: (43) 3371 6000 - Fax: 3371 6100
Home page: www.cnpso.embrapa.br
e-mail: sac@cnpso.embrapa.br



1ª edição
1ª impressão 12/2008: tiragem 400 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: José Renato Bouças Farias
Secretária Executiva: Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite
Membros: Antonio Ricardo Panizzi, Claudine Dinali Santos Seixas, Francismar Corrêa Marcelino, Ivan Carlos Corso, Maria Cristina Neves de Oliveira, Norman Neumaier, Rafael Moreira Soares, Sérgio Luiz Gonçalves

Expediente

Coordenador de editoração: Odilon Ferreira Saraiva
Normalizador bibliográfico: Ademir Benedito Alves de Lima
Diagramação: Eliane de Oliveira