

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO RECOMENDADAS PARA AS CULTURAS DA SOJA E DO FEIJOEIRO BASEADA NO SEQÜENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA<sup>(1)</sup>

L. M. O. CHUEIRE<sup>(2)</sup>, E. V. BANGEL<sup>(3)</sup>, F. L. MOSTASSO<sup>(2)</sup>,  
R. J. CAMPO<sup>(2)</sup>, F. O. PEDROSA<sup>(4)</sup> & M. HUNGRIA<sup>(2)</sup>

### RESUMO

As culturas da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) são de grande importância econômica e social para o Brasil e ambas podem ter seu requerimento de nitrogênio suprido pela simbiose com bactérias da ordem Rhizobiales. Para garantir a maximização do processo biológico, deve-se proceder à inoculação de estirpes de rizóbio eficientes e competitivas, recomendadas pela pesquisa. No Brasil, foram comercializados, na safra 2001/2002, 14 milhões de doses de inoculantes, dos quais 99 % para as culturas da soja e do feijoeiro. Neste trabalho, determinou-se a posição taxonômica das estirpes utilizadas em inoculantes comerciais para as duas culturas, pelo seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, que é suficientemente variável, mas carrega as informações necessárias para permitir a análise filogenética de bactérias. O seqüenciamento permitiu definir que duas das estirpes recomendadas para a cultura da soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= 29 w), pertencem à espécie *Bradyrhizobium elkanii* e as duas outras, SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (= CPAC 7), à espécie *B. japonicum*. Determinou-se, ainda, que a estirpe SEMIA 4080 (=PRF 81), recomendada para o cultura do feijoeiro, pertence à espécie *Rhizobium tropici*. As seqüências obtidas foram depositadas no banco mundial de genes do National Center for Biotechnology Information.

**Termos de indexação:** *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, soja, feijoeiro, *Rhizobium tropici*, inoculantes.

<sup>(1)</sup> Trabalho recebido para publicação em março de 2001 e aprovado em agosto de 2003.

<sup>(2)</sup> Pesquisador da Embrapa Soja. Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina (PR). E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Pesquisador da FEPAGRO. Rua Gonçalves Dias 579, CEP 90130-060 Porto Alegre (RS).

<sup>(4)</sup> Professor do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Caixa Postal 19046, CEP 81531-990 Curitiba (PR).

**SUMMARY:** *TAXONOMIC CLASSIFICATION OF RHIZOBIAL STRAINS RECOMMENDED FOR SOYBEAN AND COMMON BEAN CROPS IN BRAZIL BASED ON THE SEQUENCING OF THE 16S rRNA GENE*

*Soybean [Glycine max (L.) Merrill] and common bean (Phaseolus vulgaris L.) crops are of economical and social importance in Brazil; their requirement for nitrogen can be supplied by the symbiosis with bacteria belonging to the order Rhizobiales. However, to guarantee the maximization of the biological nitrogen fixation, seeds must be inoculated with efficient and competitive strains of rhizobia recommended by research. In 2001/2002, 14 million doses of inoculant were sold in Brazil, 99 % of these for soybean and common bean crops. In this study the taxonomic position of the strains used in commercial inoculants for both crops was evaluated by sequencing the DNA region that carries the information for the 16S rRNA gene. Although variable, it codes enough information to allow a phylogenetic analysis of the bacteria. Sequencing determined that two of the strains recommended for the soybean crop, SEMIA 587 and SEMIA 5019 (= 29 w), belong to the Bradyrhizobium elkanii, while the two other, SEMIA 5079 (=CPAC 15) and SEMIA 5080 (=CPAC 7), belong to the B. japonicum species. Strain SEMIA 4080 (=PRF 81), recommended for common bean crop, was identified as member of the species Rhizobium tropici. The sequences were included in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information.*

*Index terms:* Bradyrhizobium elkanii, Bradyrhizobium japonicum, soybean, common bean, Rhizobium tropici, inoculants.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], razão pela qual esta é a leguminosa de maior importância econômica para o País. O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), por sua vez, representa de 20 a 28 % das proteínas ingeridas pela população. Ambas as culturas podem obter o nitrogênio (N) necessário para o crescimento das plantas pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), resultante da associação com diversas bactérias coletivamente chamadas de rizóbios (Hungria et al., 1997; Vargas & Hungria, 1997). O mercado brasileiro de inoculantes com estirpes de rizóbio é um dos maiores do mundo, tendo sido comercializados, na safra 2001/2002, 14 milhões de doses, dos quais mais de 95 % destinados para a cultura da soja e cerca de 4 % para a cultura do feijoeiro (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dados não publicados).

Para classificar as diversas espécies de rizóbio, foram, tradicionalmente, utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos, como a taxa de crescimento em meio de cultura que continha manitol, a habilidade em utilizar fontes de carbono e de nodular leguminosas hospedeiras, dentre outros (Jordan, 1984). Contudo, particularmente nas últimas duas décadas, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando um espaço crescente nos estudos de taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbio.

Como resultado do nível elevado de informação proporcionado por essas análises, tem-se que, até 1984, os rizóbios eram classificados em uma família, dois gêneros e seis espécies (Jordan, 1984) e, hoje, estão definidas quatro famílias (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*), seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), mais de 30 espécies e vários biovares, todos na ordem *Rhizobiales* (Garrity & Holt, 2001).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial na região que codifica o gene 16S rRNA, considerada conservada entre as bactérias, mas, ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991), até mesmo entre os rizóbios e agrobactérias (Willems & Collins, 1993).

Os estudos de filogenia também se beneficiaram pela técnica de PCR (análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de seqüências definidas do DNA (Saiki et al., 1988), o que facilitou as análises da molécula do 16S rRNA (Young et al., 1991; Yanagi & Yamasato, 1993). A técnica do seqüenciamento de genes, porém, exige um investimento inicial elevado e, desse modo, relações genéticas entre as estirpes têm sido

investigadas com outras técnicas, como a PCR de regiões de genes cromossômicos conservadas, como o próprio 16S rRNA, associada ao método de RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (Laguerre et al., 1994) e à PCR com oligonucleotídeos ("primers") específicos (de Bruijn, 1992). Essas técnicas, porém, não conseguem determinar, de modo preciso, a posição filogenética das bactérias, daí a razão de os comitês internacionais de taxonomia determinarem a necessidade de seqüenciamento de toda a região do 16S rRNA.

De 1932 a 1980, as bactérias que nodulam a soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum* (Fred et al., 1932; Buchanan, 1980), embora fosse salientado que diferiam de um grupo grande de estirpes de rizóbio, por apresentar crescimento lento e reação alcalina em meio de cultura que continha manitol como fonte de carbono. A partir de 1982, as bactérias da espécie *R. japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium* ("bradus", grego, significando lento), que apresentava uma única espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (Buchanan 1980) Jordan, 1982 (Jordan, 1982, 1984). Já a partir da década de 80, vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, conseqüentemente, Kuykendall et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*.

Alguns estudos já foram realizados com as quatro estirpes que hoje são utilizadas em inoculantes comerciais brasileiros para a cultura da soja, SEMIA 587, SEMIA 5019 (= 29 w), SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7). Inicialmente, a análise genética por hibridização com a seqüência 16S rRNA (Rumjanek et al., 1993) indicou que as estirpes SEMIAs 587 e 5019 pertenciam à espécie *B. elkanii*. Já Lunge et al. (1994), pela análise de RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) com 11 oligonucleotídeos arbitrários, verificaram que cada estirpe foi posicionada em um grupo distinto, enquanto, pela técnica de RFLP com marcadores *nif* e *nod*, as estirpes foram divididas em dois grupos distintos, SEMIA 5079-SEMIA 5080 e SEMIA 587-SEMIA 5019. Esse agrupamento também foi confirmado por Lemos (1994), pela análise de locos enzimáticos múltiplos, sorologia, morfologia de colônia e atividade de hidrogenase por Sato et al. (1999), também por RAPD.

Em relação à classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro, até 1984, estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984). Desde então, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma grande diversidade genética entre os microssimbiontes, permitindo, assim, a definição de novas espécies: *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997), existindo, ainda,

diversas estirpes sem posição taxonômica definida, que podem representar novas espécies (Eardly et al., 1995).

Para a cultura do feijoeiro, são recomendadas, atualmente, duas estirpes, a SEMIA 4077 (= CIAT 899) e a SEMIA 4080 (= PRF 81), esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1998, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N<sub>2</sub> e competitividade contra rizóbios nativos em diversos ensaios realizados no Brasil (Hungria et al., 2000). A SEMIA 4077 é a estirpe-padrão da espécie *R. tropici* e pertence ao tipo IIB (Martínez-Romero et al., 1991) e a SEMIA 4080 apresenta propriedades fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB de *R. tropici* (Hungria et al., 2000), mas sua posição taxonômica exata ainda necessita ser definida.

Informações genéticas sobre os rizóbios que são recomendados comercialmente são necessárias e devem constar nos bancos mundiais de genes. Neste trabalho, portanto, realizou-se o seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, para determinar a posição taxonômica das estirpes comerciais recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estirpes utilizadas

Para a cultura da soja, foram utilizadas as quatro estirpes recomendadas comercialmente, SEMIA 5019 (= 29 w), SEMIA 587, SEMIA 5079 (= CPAC 15) e SEMIA 5080 (= CPAC 7), além das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586 (= CB 1809, = USDA 136b, = TAL 379) e SEMIA 5085 (recomendada em inoculantes comerciais na Argentina), todas recebidas do banco de germoplasma de rizóbio da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS). Como referência, foram utilizadas as estirpes de *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (= ATCC 10324, = 3I1b6, = RCR 3425, estirpe-padrão para a espécie), USDA 110 (= 3I1b110, = TAL 102, = RCR 3427, = 61A89) e USDA 123; e de *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup> (padrão para a espécie), USDA 31 e USDA 94, todas provenientes do United States Department of Agriculture (USDA), Beltsville, MD, EUA. Para o feijoeiro, foram utilizadas as duas estirpes recomendadas comercialmente, *R. tropici* IIB SEMIA 4077<sup>T</sup> (= CIAT 899, = UMR 1899, = USDA 9030, = TAL 1797, = HAMBÍ 1163, = ATCC 49672, padrão para a espécie), recebida do Centro de Fijación de Nitrógeno (CFN), Cuernavaca, México, e as estirpes SEMIA 4080 (=PRF 81), PRF 35 e PRF 54, isoladas de solos do Paraná (Hungria et al., 2000) e provenientes do banco de rizóbios da Embrapa Soja.

### Seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA

Para a extração do DNA, as bactérias foram cultivadas em meio YM (Vincent, 1970) modificado (contendo 5,0 g L<sup>-1</sup> de manitol), por três dias, para rizóbio de crescimento rápido (*Rhizobium*); por cinco dias, para rizóbio de crescimento lento (*Bradyrhizobium*). Posteriormente, as bactérias foram centrifugadas (11.750 g) e lavadas com solução salina tamponada de fosfato [PBS contendo, em 500 mL, 4,383 g de NaCl (150 mmol L<sup>-1</sup>); 0,1793 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2,6 mmol L<sup>-1</sup>); 1,36 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (7,6 mmol L<sup>-1</sup>)]. O pélete foi diluído (10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>), centrifugado e o pélete foi ressuspenso em 400 mL de TE 50/20 e recebeu 50 µL de SDS (sodium dodecyl sulphate) a 10 % (p/v); 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>, preparado em Tris HCl 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5 e NaCl 15 mmol L<sup>-1</sup>), sendo incubado a 37 °C por 1 h.

A seguir, as amostras foram passadas por seringa por três vezes, para retirar a viscosidade, seguindo-se a adição de NaCl e acetato de sódio em concentrações finais de 250 mmol L<sup>-1</sup> e 300 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e armazenadas a -20 °C.

Após a extração do DNA das bactérias, procedeu-se à amplificação do mesmo pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3'), que amplificam praticamente toda a região do DNA (1.500 pares de bases, pb) que codifica o gene 16S rRNA, conforme descrito anteriormente (Chen et al., 2000). O sistema para reação de amplificação foi realizado com duas repetições em uma mistura com volume final de 50 µL, constituída por: 38,30 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada; 2,0 µL de dNTPs (1,5 mmol L<sup>-1</sup> de cada); 5,0 µL de tampão 10X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol L<sup>-1</sup>); 0,5 µL de cada "primer" (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 da amostra (50 ng).

O ciclo para a amplificação foi o descrito por Young et al. (1991), com um incremento de 2 °C na temperatura de anelamento, consistindo de: 1 ciclo de desnaturação inicial a 93 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação (45 segundos a 93 °C), anelamento (45 segundos a 64 °C) e extensão (2 min a 72 °C); 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min, e de manutenção a 4 °C. Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando o kit "Concert Rapid PCR Purification System" da Invitrogen Life Technologies (EUA) e foram quantificados em espectrofotômetro (260 e 280 nm). Os fragmentos de PCR (70 ng para Y1 e 40 ng para os demais) foram amplificados novamente, utilizando os oligonucleotídeos (3,2 pmol µL<sup>-1</sup>) Y1, Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3',

Young et al., 1991) e oligonucleotídeos intermediários, conforme especificado em Chen et al. (2000), bem como o kit "Big Dye" (Applied Biosystems, EUA), 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. As amostras foram precipitadas com 75 % de isopropanol, deixadas à temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) por 15 min e centrifugadas a 11.750 g por 20 min a 25 °C. O sobrenadante foi removido, adicionaram-se 250 µL de isopropanol a 75 % (v/v), procedendo-se à mistura em um vórtex.

Cada amostra foi centrifugada novamente por 5 min, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e, então, aquecido a 90 °C por 1 min. As amostras foram ressuspenso em 8 µL de tampão (formamida e azul de dextran, 5:1, v:v) e aquecidas novamente por 2 min a 95 °C, seguido de um choque térmico em gelo. Para o seqüenciamento, 2 µL de cada amostra foram aplicados em um gel de poliácridamida (Long Ranger Singel Packs, FMC, EUA), e as seqüências foram determinadas em um seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

As seqüências confirmadas nas direções 3' e 5' foram submetidas ao banco de genes ("GeneBank database") do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), para buscar alinhamentos significativos. Para a análise filogenética, as seqüências obtidas neste trabalho foram alinhadas com as seqüências das seguintes estirpes, obtidas no banco de germoplasma (número de acesso entre parênteses): *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (U69638.2), USDA 110 (Z35330.1), USDA 122 (D85408), USDA 136 (L23331); *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup> (U35000.2), USDA 94 (D13429); *R. leguminosarum* bv. phaseoli ATCC 8002 (M55494); *R. tropici* IIA LMG 9518 (X67233.1); *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> (M64317); *R. tropici* IIB CIAT 899<sup>T</sup> (= SEMIA 4079) (U89832), *R. gallicum* bv. gallicum R602<sup>T</sup> (U86343) e *R. giardinii* bv. giardinii H152<sup>T</sup> (U86344). As seqüências obtidas neste trabalho e aquelas provenientes do banco de genes foram alinhadas e as árvores genéticas foram construídas usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average, método de agrupamento de médias aritméticas) (Sneath & Sokal, 1973) e o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Somente as bases confirmadas sem nenhum erro de leitura foram consideradas e, portanto, o comprimento das seqüências das estirpes analisadas variou de 1.384 a 1.411 pb, o que compreende quase

toda a região que codifica o gene 16S rRNA. As seqüências das quatro estirpes comerciais para a cultura da soja foram depositadas no banco de genes (GenBank do NCBI) e receberam os seguintes números de acesso: SEMIA 587 (AF234890), SEMIA 5019 (AF237422), SEMIA 5079 (AF234888) e SEMIA 5080 (AF234889). As estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, USDA 123 e USDA 31 também foram seqüenciadas e submetidas ao GenBank e receberam os números de acesso AF236086 a AF236089, respectivamente, enquanto a SEMIA 5085 recebeu o acesso AY117677.

Quando as seqüências das quatro estirpes comerciais foram submetidas ao GenBank para verificar alinhamentos significativos, constatou-se que a SEMIA 587 mostrou 99 % de identidade (1.384 pb em 1.389 bp) com *Bradyrhizobium* sp. estirpe LMG 9520 (X70402.1), isolada de *Acacia albida*, bem como com *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup> (U35000.2). A estirpe SEMIA 5019 também mostrou 99 % de identidade com essas mesmas estirpes, com similaridade em 1.407/1.411 pb e 1.408/1.411 pb, respectivamente. Já a SEMIA 5080 mostrou 99 % de identidade (1.401/1.403 pb) com a estirpe USDA 110 (Z35330.1) de *B. japonicum*. Finalmente, a SEMIA 5079 apresentou 99 % de identidade (1.409/1.411 pb) com a estirpe USDA 6<sup>T</sup> (U69638.2) e a SEMIA 5085 de *B. japonicum*.

As relações filogenéticas das quatro estirpes comerciais com algumas estirpes utilizadas como referência podem ser visualizadas na figura 1, podendo-se constatar que as duas espécies de *Bradyrhizobium* formaram dois grupos distintos. As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 foram agrupadas com as estirpes de *B. elkanii*, todas apresentando uma relação genética de 97,05 %, tendo a SEMIA 5019 apresentado identidade total de bases com a USDA 31.

No segundo grupo, posicionaram-se as estirpes já classificadas na espécie *B. japonicum* e as SEMIAs 5079 e 5080, apresentando identidade de 98,95 %. Houve grande similaridade entre as seqüências dos pares de estirpes SEMIA 566-SEMIA 5079 e SEMIA 586-SEMIA 5080, sendo as duas estirpes comerciais consideradas variantes obtidas no programa de seleção de estirpes da Embrapa Cerrados (Vargas et al., 1992; Vargas & Hungria, 1997). Embora as estirpes comerciais SEMIA 5079 e SEMIA 5080 apresentem identidade elevada com suas respectivas parentais na seqüência de bases dessa região cromossômica conservada, foram relatadas diferenças importantes entre elas em diversas características morfológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas (Nishi et al., 1996; Boddey & Hungria, 1997; Hungria et al., 1996, 1998).

A seqüência da estirpe SEMIA 566 foi idêntica à da USDA 123, estirpe altamente competitiva e dominante nos solos do meio-oeste dos EUA (Schmidt et al., 1986); essas duas estirpes também

apresentaram identidade total de bases com a USDA 6, estirpe representativa ("type strain") da espécie *B. japonicum* e com a SEMIA 5085, utilizada em inoculantes comerciais na Argentina. A seqüência da SEMIA 586 diferiu da obtida para a USDA 136 que, segundo Sato et al. (1999), seria a CB 1809, enviada dos EUA para a Austrália e, então, para o Brasil, em 1966, onde recebeu a denominação de SEMIA 586. Contudo, a SEMIA 5080 apresentou identidade total com a USDA 122, também proveniente dos EUA, embora a seqüência desta última (D85408) conste de apenas 264 pb; já a comparação com outra seqüência depositada da USDA 122 (AF234889) mostrou 99 % de similaridade com a SEMIA 5080.

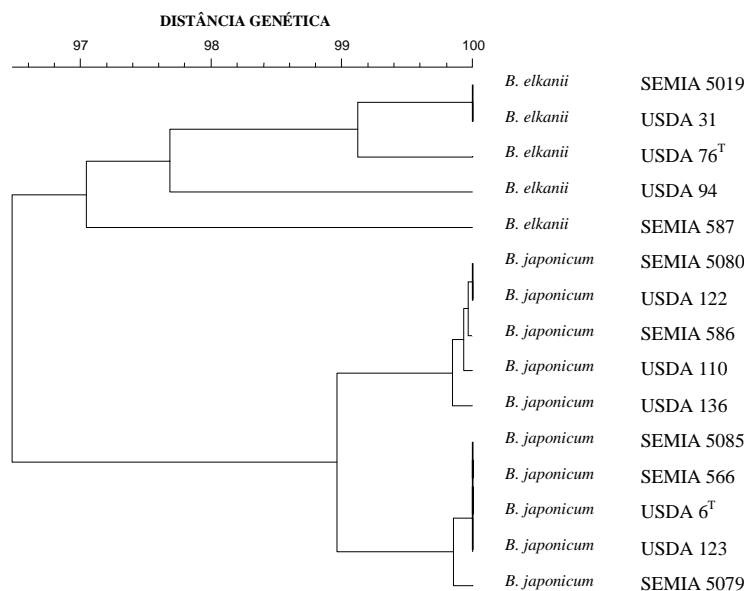
O gênero *Bradyrhizobium* apresenta pouca variabilidade genética, dificultando a separação das espécies. Desse modo, técnicas como a RFLP-PCR da região 16S rRNA, embora possibilitem a separação de diversas espécies de rizóbio (Laguerre et al., 1994), nem sempre são capazes de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, como *B. japonicum* de *B. elkanii* e *R. tropici* de *Agrobacterium* (Laguerre et al., 1994; Chueire et al., 2000a). Torna-se essencial, então, realizar o seqüenciamento de regiões do DNA como a que codifica o gene 16S rRNA e, embora o seqüenciamento parcial desse gene já contribua com diversas informações (Chueire et al., 2000a), somente pela análise total do gene, conforme determinado neste trabalho, é possível classificar as estirpes nas espécies de rizóbio já descritas. As duas espécies de *Bradyrhizobium* foram bem definidas, formando dois grupos distintos, com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 agrupadas com a espécie *B. elkanii*, e as SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com a espécie *B. japonicum* (Figura 1).

As seqüências obtidas para os microssimbiontes do feijoeiro também foram submetidas ao GenBank, recebendo os seguintes números de acesso: PRF 35 (AF260298), PRF 54 (AF260275) e SEMIA 4080 (AF260274). A SEMIA 4080 apresentou 99 % de identidade (1.382/1.387 pb) com *Rhizobium* espécie genômica Q estirpe BDV5102 (Z94806.1), isolada de um arbusto nativo na Austrália, *Daviesia leptophylla* (Lafay & Burdon, 1998). Já as estirpes PRF 35 e PRF 54 apresentaram 99 % de identidade (1.392/1.406 pb e 1.392/1.403 pb, respectivamente) com a estirpe de *Rhizobium* sp. LMG 9509 (X67232.1), descrita por Willems & Collins (1993). Essas duas estirpes também apresentaram identidade de bases elevada com *Agrobacterium*, confirmando a semelhança genética de vários isolados de rizóbio das regiões tropicais com bactérias desse gênero (Khabaya et al., 1998; Chen et al., 2000) que inclui, principalmente, patógenos de raízes. Inclusive, recentemente, foi sugerida a revisão do gênero *Agrobacterium* para *Rhizobium* (Young et al., 2001).

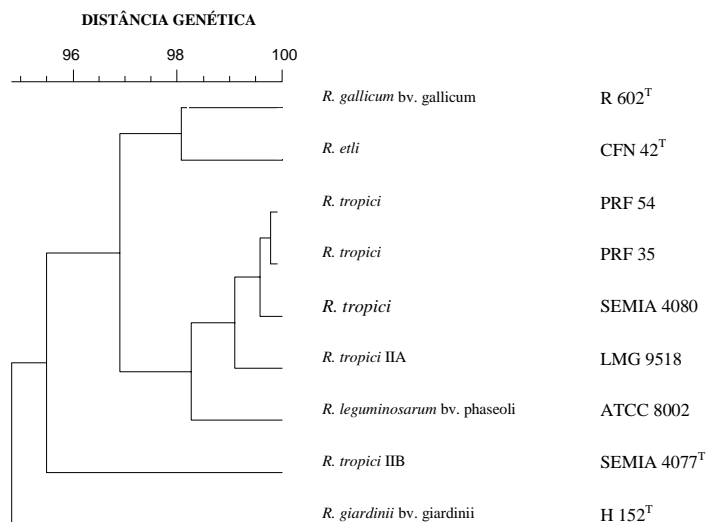
Como descrito por Hungria et al. (2000), as estirpes PRF 35 e PRF 54 apresentaram semelhança

nos perfis de DNA amplificados com os oligonucleotídeos ERIC, REP e por RAPD e, de fato, neste trabalho, constatou-se identidade de bases elevada entre as estirpes (Figura 2). Resultados de diversas análises morfológicas, fisiológicas e genéticas indicaram que PRF 35, PRF 54 e a SEMIA 4080 apresentavam características intermediárias entre *R. tropici* IIA e IIB e, neste estudo, o seqüenciamento da região que codifica o 16S rRNA indicou maior semelhança com *R. tropici* IIA (Figura 2). A escolha de estirpes pertencentes à espécie *R. tropici* em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro é muito importante, pela maior estabilidade genética dessa espécie (Hungria et al., 1997).

Perfis distintos para cada uma das estirpes recomendadas para a cultura da soja foram obtidos pelas análises de lipopolissacarídeos e de DNA após a amplificação com os oligonucleotídeos específicos ERIC, REP e BOX (Chueire et al., 2000b; Bangel, 2000) ou por RAPD (Sato et al., 1999; Bangel, 2000; Chueire et al., 2000b). Essas mesmas técnicas conseguem diferenciar as estirpes recomendadas para a cultura do feijoeiro (Chueire et al., 2000b; Hungria et al., 2000). O reconhecimento de cada uma das estirpes comerciais é essencial para o controle dos inoculantes que, obrigatoriamente, devem carregar exclusivamente essas estirpes. Além disso, o seqüenciamento do 16S rRNA torna-se uma



**Figura 1. Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rRNA das estirpes SEMIA recomendadas comercialmente para a cultura da soja e das estirpes representativas das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*.**



**Figura 2. Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rRNA das estirpes SEMIA recomendadas para a cultura do feijoeiro e das estirpes representativas das espécies de *Rhizobium* capazes de nodular essa leguminosa.**

ferramenta útil para o estabelecimento da diversidade de rizóbio no Brasil.

### AGRADECIMENTOS

Pesquisa financiada pelo Programa de Grupos de Excelência, PRONEX (CNPq), pelo CNPq (520396/96-0) e pelo projeto EC-INCO (ERBIC18CT980321).

### LITERATURA CITADA

- AMARGER, N.; MACHERET, V. & LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol., 47:996-1006, 1997.
- BANGEL, E.V. Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. 115p. (Tese de Mestrado)
- BODDEY, L.H. & HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. Biol. Fertil. Soils, 25: 407-415, 1997.
- BUCHANAN, R.E. Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol., 30:225-240, 1980.
- CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O. & HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. Appl. Environ. Microbiol., 66:5099-5103, 2000.
- 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, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2000a. 32p. (Embrapa Soja. 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. Agric. Trop., 4:80-95, 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. Appl. Environ. Microbiol., 58:2180-2187, 1992.
- EARDLY, B.D.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S. & SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol., 61:507-512, 1995.
- FRED, E.B., BALDWIN, I.L. & MCCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants. Madison, University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Springer-Verlag, 2001. v.1. p.119-166.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J. & MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biol. Biochem., 32:1515-1528, 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. Biol. Fertil. Soils, 27:393-399, 1998.
- HUNGRIA, M.; NISHI, C.Y.M.; COHN, J. & STACEY, G. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N<sub>2</sub> fixation rates. Plant Soil, 186:331-341, 1996.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. *Biologia dos solos dos Cerrados*. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p.189-295.
- JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol., 32:136-139, 1982.
- JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.
- KHABAYA, B.; NEYRA, M.; NORMAND, P.; ZERHARI, Z. & FILALI-MALTOUF, A. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol., 64:4912-4917, 1998.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E. & UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can. J. Microbiol., 38:501-505, 1992.
- LAFAY, B. & BURDON, J.J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. Appl. Environ. Microbiol., 64:3989-3997, 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. Appl. Environ. Microbiol., 60:56-63, 1994.
- LEMOES, E.G.M. Classificação e identificação de bradirrízobios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase. Jaboticabal, Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1994. 108p. (Tese de Livre-Docência)

- LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; HIRIGOYEN, D.; STOLL, M.; BONATTO, S. & OZAKI, L.S. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10:648-652, 1994.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H. & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41:417-426, 1991.
- NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. *Symbiosis*, 20:147-162, 1996.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; VAN BERKUM, P. & TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:4371-4373, 1993.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, E.T. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
- SATO, M.L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C. & VAN BERKUM, P. Verification of strain identity in Brazilian soybean inoculants by using the polymerase chain reaction. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15:387-391, 1999.
- SCHMIDT, E.L.; ZIDWICK, M.J. & ABEBE, H.H. *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 and diversity among member isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:1212-1215, 1986.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:374-377, 1993.
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy*. San Francisco, W.H. Freeman, 1973. 573p.
- VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p.297-360.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1992. 3p. (Comunicado Técnico, 62)
- VINCENT, J.M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15)
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A. & LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173:697-703, 1991.
- WILLEMS, A. & COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:305-313, 1993.
- WOESE, C.R. Bacteria evolution. *Microbiol. Rev.*, 51:221-271, 1987.
- YANAGI, M. & YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 107:115-120, 1993.
- 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. *J. Bacteriol.*, 73:2271-2277, 1991.
- YOUNG, J.P.Y.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A. & SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:89-103, 2001.