

Caracterização da estirpe de *Sinorhizobium fredii* CPAC 402: provável evento de transferência lateral de genes simbióticos em solos dos Cerrados entre gêneros distintos de rizóbios

Jesiane Stefania da Silva Batista¹; Fernando Gomes Barcellos²; Pâmela Menna¹; Pedro Alberto Ballati³; Mariangela Hungria⁴. ¹Aluna de Doutorado UEL - DTI CNPq; ²Bolsista ProDoc CAPES; ³Faculdade de Ciências Agrárias e Florestais da Universidad Nacional de La Plata; ⁴Embrapa Soja.

Introdução

A disponibilidade de nitrogênio (N) é um dos fatores nutricionais limitantes à produção agrícola, bem como para a manutenção de ecossistemas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui a principal via de incorporação do N à biosfera. A simbiose com rizóbios eficientes no processo de FBN pode resultar no fornecimento de todo o N necessário ao desenvolvimento de diversas leguminosas, tais como a soja (Hungria et al., 1994).

O método que vem sendo empregado com maior sucesso no Brasil para a seleção de estirpes adaptadas para a cultura da soja consiste na inoculação de uma área, sucedida por um período de adaptação e o reisolamento das bactérias de nódulos radiculares e verificação da eficiência dessas estirpes.

Uma das estirpes que foi obtida utilizando tal metodologia foi a CPAC 402. Por apresentar características contrastantes em relação à inicialmente inoculada (como acidificação em meio YM acrescido de azul de bromotimol, elevada produção de mucopolissacarídeos e eficiência superior na FBN e nodulação), esta estirpe foi caracterizada geneticamente. Através da análise de genes ribossomais e simbióticos, constatou-se que se tratava de uma estirpe de *Sinorhizobium fredii* provida de genes simbióticos de *Bradyrhizobium japonicum* (dados não apresentados)

A estirpe CPAC 402 foi isolada de nódulo de planta de soja que havia sido inoculada com a estirpe de *B. japonicum* CPAC 7, em um solo dos Cerrados ausente de estirpes bacterianas nativas capazes de nodular e fixar nitrogênio na soja. Desta forma supõe-se que essa possa ser uma estirpe nativa do solo dos Cerrados que tenha adquirido a capacidade de nodular e fixar o nitrogênio em plantas de soja através da transferência lateral de genes a partir da estirpe de *B. japonicum* inoculada.

Objetivos

Caracterizar a estirpe CPAC 402 de *S. fredii* quanto aos parâmetros de produção de melanina, PCR multiplex dos genes *noiXWBTUV* de *S. fredii* e *RS α* de *B. japonicum*, amplificação por PCR e caracterização do gene ribossomal 23S e obtenção do perfil plasmidial.

Material e Métodos

Caracterização da produção de melanina

A produção de melanina foi identificada em algumas espécies bacterianas, inclusive em rizóbios, sendo inicialmente descrita em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. A estirpe CPAC 402 de *Sinorhizobium fredii* foi testada quanto a tal capacidade, juntamente com estirpes padrões das espécies *S. fredii*, *B. japonicum* e *B. elkanii*, segundo a metodologia descrita por Cubo et al. (1988). Para tanto, as bactérias foram crescidas (3 a 4 dias para as estirpes de crescimento rápido e 7 dias para as de crescimento lento) em meio TY, suplementado com L-tirosina (600 μ g/ml) e CuSO₄ (40 μ g/ml). A presença de um pigmento escuro e difuso após a adição de 0,05mL de SDS 10% em TBE e incubação por 24 horas é o indicativo da produção de melanina.

PCR multiplex

Pastorino et al. (2003) desenvolveram uma metodologia sensível e altamente eficiente que possibilita a discriminação entre *S. fredii*, *B. japonicum* e *S. xinjiangensis* em uma única reação de PCR (PCR multiplex), que foi adotada nesta caracterização. Os primers são baseados nas seqüências

dos genes *noIXWBTUV* de *S. fredii* e *RS α* de *B. japonicum* e a identificação é feita através da presença/ausência de uma banda de 730kb ou de 900 kb, respectivamente.

Amplificação do gene ribossomal 23S

Variações no tamanho e número de fragmentos amplicados do gene ribossomal 23S são amplamente utilizados na identificação de estirpes (Parker, 2002). Assim, baseando-se em seqüências deste gene depositadas em bancos de dados, Balatti (2005, comunicação pessoal) desenvolveu um par de primers específicos para a amplificação deste gene em estirpes do gênero *Sinorhizobium*, utilizados neste trabalho.

Obtenção do perfil plasmidial

Para analisar a estirpe CPAC 402 quanto à presença e número de plasmídeos, uma metodologia de lise das células diretamente no poço do gel foi adotada. Para tanto, foram obtidas culturas em meio TY das estirpes HH 103, USDA 205 e CPAC 402 de *S. fredii*, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *B. japonicum* e SEMIA 5019 e SEMIA 587 de *B. elkanii*. Após a lavagem das células, as mesmas foram resuspensas em uma solução de resuspensão contendo Tris-ficoll, lisozima, RNase e tampão de corrida e logo aplicadas no poço do gel de agarose.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 0,5% em TBE, porém com uma camada (de cerca de 3mm de espessura) de gel de agarose 0,5% + SDS 15% em TBE, disposta atrás do pente acrílico utilizado para formar os poços do gel. O SDS auxilia na lise das células e esta metodologia garante a integridade do DNA plasmidial.

Resultados e Discussão

Produção de melanina

As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*B. japonicum*) e SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*B. elkanii*) apresentaram resposta negativa (dados não mostrados), corroborando com os dados obtidos por Cubo et al. (1988).

Segundo Cubo et al. (1988), na estirpe USDA 205 de *S. fredii*, a produção de melanina parece estar relacionada com a presença de um pequeno plasmí-

deo não-simbiótico; a estirpe HH 103 da mesma espécie também apresentou tal habilidade. No entanto, não foi detectada a produção de melanina pela estirpe CPAC 402, assim como a estirpe SMH 12. A correlação entre produção de melanina e atividade simbiótica ainda não foi estabelecida, porém várias implicações biológicas são sugeridas (Mercado-Blanco et al., 1993).

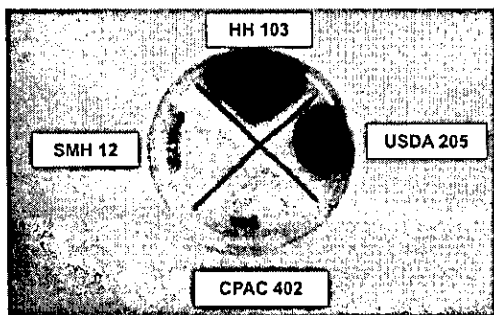


Figura 1. Detecção da produção de melanina por estirpes de *S. fredii*.

PCR multiplex

A Figura 2 apresenta os respectivos produtos obtidos pela reação de PCR multiplex. A estirpe CPAC 402 apresentou tanto a banda característica da espécie *S. fredii* (de 730 kb) quanto o produto de amplificação de seqüências RS α (de 900kb). Goettfert et al. (2002), através do seqüenciamento da ilha simbiótica da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* resalta o grande número de cópias de seqüências RS α nesta região, o que foi posteriormente confirmado por Kaneko et al. (2002), que realizou o seqüenciamento do genoma completo da mesma estirpe. Assim, a hipótese de transferência

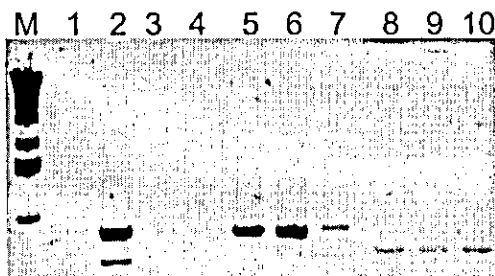


Figura 2. PCR multiplex. M: marcador de peso molecular; 1: SEMIA 134; 2: CPAC 402; 3: SEMIA 103; 4: SEMIA 135; 5: SEMIA 5079; 6: SEMIA 5080; 7: SEMIA 5019; 8: HH 103; 9: USDA 205; 10: USDA 257.

lateral da ilha simbiótica de estirpe inoculante de *B. japonicum* para a estirpe CPAC 402 é novamente evidenciada.

Amplificação do gene 23S rRNA

Os produtos de PCR das estirpes de *S. meliloti* e *S. fredii* apresentaram tamanhos variáveis, entre 506 e 344kb. Como pode ser observado na Figura 3, tanto as estirpes de *B. japonicum* quanto a estirpe USDA 5019 de *B. elkanii* não apresentaram produto de amplificação. A estirpe CPAC 402 de *S. fredii* apresentou uma banda de mesmo peso molecular que a estirpe HH 103 da mesma espécie e das estirpes SEMIA 103, SEMIA 134 e SEMIA 135 de *S. meliloti*. Variações no tamanho entre cópias distintas do gene ribossomal 23S são a provável explicação para as múltiplas bandas encontradas na estirpe SEMIA 6161 e USDA 257, como previamente descrito por Laguerre et al. (1996).

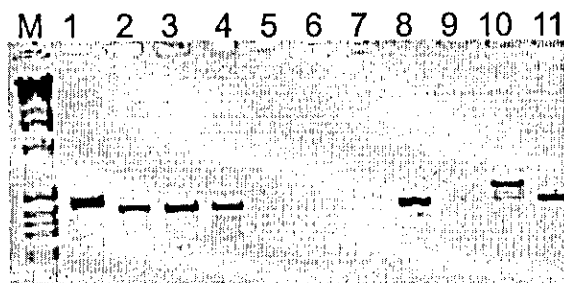


Figura 3. Produtos de amplificação por PCR utilizando primers específicos para região do gene ribossomal 23S rRNA do gênero Sinorhizobium. M: marcador de peso molecular; 1:SEMIA 6161; 2:SEMIA 103; 3:SEMIA 134; 4:SEMIA 135; 5:SEMIA 5079; 6:SEMIA 5080; 7:SEMIA 5019; 8: CPAC 402; 9: 9.8; 10:USDA 257; 11:HH 103.

Obtenção do perfil plasmidial

Como pode ser visto na Figura 4 e corroborando com experimentos anteriores, as estirpes estudadas de *B. japonicum* e *B. elkanii* não possuem plasmídeos. A estirpe CPAC 402 apresentou quatro plasmídeos, assim como a estirpe USDA 205; no entanto, o quarto plasmídeo apresentado no perfil possui tamanho menor do que o menor plasmídeo da USDA 205.

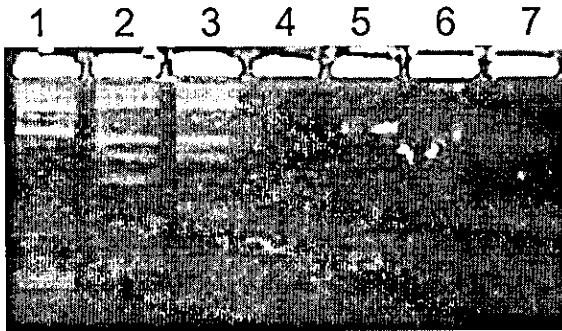


Figura 4. Perfil plasmidial das estirpes: 1:HH 103; 2:USDA 205; 3:CPAC 402; 4: SEMIA 5079; 5:SEMIA 5080; 6:SEMIA 587 e 7:SEMIA 5019.

Considerações Finais

A transferência lateral de genes simbióticos possui grande importância, pois capacita a bactéria a explorar um novo nicho ecológico. Além disso, a ocorrência de tal processo abre novas perspectivas ao estudo da taxonomia dos rizóbios. Os resultados obtidos com o presente estudo permitiram a identificação da ocorrência da transferência horizontal de genes simbióticos a partir de estirpe inoculada para rizóbio nativo dos solos dos Cerrados (CPAC 402), bem como demonstrar as características mistas desta estirpe. O conhecimento da ocorrência desses eventos permitirá o desenvolvimento de novas estratégias para a busca de estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas na FBN.

Referências

- CUBO, M. T.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; BERINGER, J. E.; RUIZ-SAINZ, J. E. Melanin production by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1812-1817, 1988.
- MERCADO-BLANCO, J.; GARCIA, F.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5403-5410, 1993.

PASTORINO, G. N.; MARTINEZ ALCANTARA, V.; BALATTI, P. A. Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr) by a multiplex PCR reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 2, p.153-158, 2003.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, n. 6, p.189-197, 2002.

GÖTTFERT, M.; RÖTHLISBERGER, S.; KÜNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R.; HENNECKE, H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1405-1412, 2001.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.; CHARNAY, M.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of Rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029-2036, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2a. Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.