

Diversidade genética de bactérias que colonizam nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em campo e em casa de vegetação.

Oliveira-Franceschini, J.P.^{1*}, Hungria, M.², Glienke, C.¹, Kava-Cordeiro, V.¹, Galli-Terasawa, L.¹

¹ Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. ² Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil.

* josielepolzin@bol.com.br

RESUMO

Foi realizado o sequenciamento parcial dos genes *16S rRNA* e *glnII* de seis isolados de nódulos radiculares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo três de plantas cultivadas a campo (LGMB10, LGMB57 e LGMB58) e três de plantas cultivadas em casa de vegetação (LGMB73, LGMB88 e LGMB99). Foi observada uma preferência de colonização de acordo com o experimento avaliado.

INTRODUÇÃO

A análise da diversidade genética de bactérias capazes de nodular o feijoeiro comum auxilia no processo de desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para a produção desta cultura, como o desenvolvimento de inoculantes contendo espécies fixadoras de nitrogênio. A associação entre a planta e o microssimbionte obedece uma estreita relação, regulada geneticamente. No entanto, bactérias nativas isoladas a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* mostram uma diversidade genética considerável, sugerindo que várias espécies de *Rhizobium* podem se associar com o feijoeiro (Eardly *et al.*, 1995; Piñero *et al.*, 1988). Ainda, variações na diversidade em condições de campo e em solos diluídos foram observadas por Alberton *et al.* (2006) e Oliveira *et al.* (2011), baseadas no estudo de marcadores moleculares. No presente trabalho, essas diferenças foram demonstradas através da análise de sequências de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Sequenciamento do gene 16S rRNA

A amplificação inicial e o sequenciamento do gene foram realizados de acordo com Menna *et al.* (2006).

Sequenciamento do gene glnII

A amplificação inicial e o sequenciamento do gene foram realizados de acordo com Stepkowski *et al.* (2005).

Análise filogenética

Para cada gene, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de linhagens já identificadas, dentre elas as linhagens tipo. O alinhamento foi realizado no programa MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e a construção da árvore filogenética no programa MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), utilizando o GTR (*General time-reversible*) como modelo evolutivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise da árvore filogenética gerada com os dados do *16S rRNA* (dados não mostrados) não foi possível inferir uma classificação precisa para os isolados a nível de espécie, uma vez que alguns deles formaram grupos com mais de uma linhagem tipo. Por outro lado, a árvore gerada com os dados do *glnII* (dados não mostrados) apresentou uma melhor resolução para as espécies avaliadas, dando um bom suporte na análise das sequências concatenadas (Figura 1).

Apesar das linhagens de *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli* e *R. phaseoli* não estarem bem resolvidas nesta análise, pode-se observar que os isolados de plantas cultivadas em casa de vegetação formaram um grupo com 100% de suporte com a espécie *R. miluonense* e os isolados provenientes do experimento a campo agruparam (100% de suporte na Inferência Bayesiana) com *R. leguminosarum*, o que oferece um forte indício para sua classificação. Desta forma, a especificidade de colonização de acordo com as condições ambientais fornece subsídios para o desenvolvimento de inoculantes comerciais com linhagens que sejam capazes de se adaptar ao ambiente em que serão utilizadas.

A caracterização genética através do gene *16S rRNA* tem sido utilizada como ferramenta de classificação para bactérias, no entanto sua análise isolada não é suficiente para diferenciar espécies estreitamente relacionadas. Sendo assim, outros genes têm sido propostos para auxiliar na realização de análises filogenéticas, dentre eles o *glnII* (Gevers *et al.*, 2005). No presente estudo, foi possível realizar uma melhor discriminação entre as espécies, baseada na análise conjunta das duas sequências gênicas. No entanto, a avaliação de um maior número de genes, além de um estudo polifásico, é recomendada para uma classificação mais precisa.

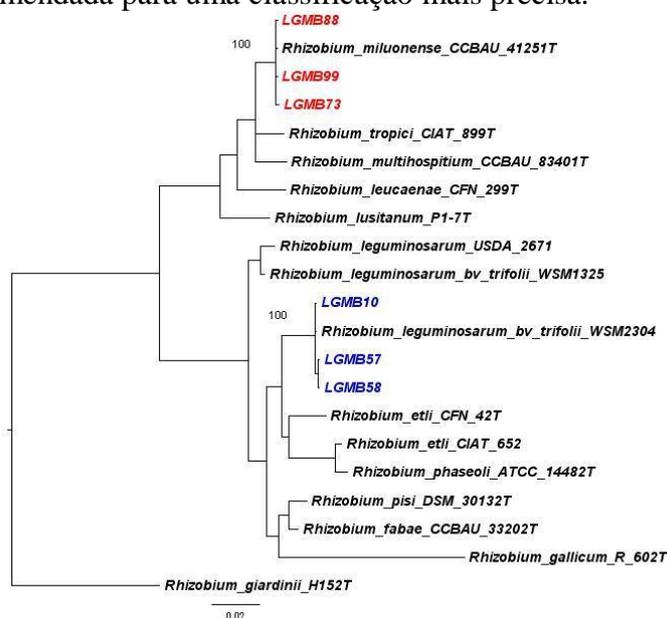


Figura 1. Árvore filogenética baseada nas sequências de *glnII* e *16S rDNA* de rizóbios isolados de nódulos radiculares de feijoeiro comum e linhagens de referência. A árvore foi gerada no programa MrBayes, utilizando GTR como modelo evolutivo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CNPq-Repensa (56008/2010-1).

REFERÊNCIAS

- Alberton, O., *et al.* (2006). *Soil Biol. Biochem.* 38: 1298-1307.
 Eardly, B.D., *et al.* (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 507-512.
 Menna, P., *et al.* (2006). *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 315-332.
 Gevers, D., *et al.* (2005). *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 733-739.
 Oliveira, J.P., *et al.* (2011). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 643-650
 Piñero, D., *et al.* (1988). *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2825-2832.
 Ronquist, F., and Huelsenbeck, J.P. (2003). *Bioinformatics.* 19: 1572-1574.
 Stepkowski, T. *et al.* (2005). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7041-7052.