



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FABIANA GISELE DA SILVA PINTO

**GENÔMICA E DIVERSIDADE DE *Rhizobium Tropicum*, UMA  
ESPÉCIE TROPICAL MICROSSIMBIONTE DO FEIJOEIRO  
(*Phaseolus Vulgaris L.*)**

---

Londrina  
2007

**FABIANA GISELE DA SILVA PINTO**

**GENÔMICA E DIVERSIDADE DE *Rhizobium Tropicum*, UMA  
ESPÉCIE TROPICAL MICROSSIMBIONTE DO FEIJOEIRO  
(*Phaseolus Vulgaris L.*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação,  
em Microbiologia da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina  
2007

**FABIANA GISELE DA SILVA PINTO**

**GENÔMICA E DIVERSIDADE DE *Rhizobium Tropici*, UMA  
ESPÉCIE TROPICAL MICROSSIMBIONTE DO FEIJOEIRO  
(*Phaseolus Vulgaris L.*)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Mariangela Hungria da Cunha [Orientador]

---

Fernando Gomes Barcellos

---

Marcia Cristina Furlaneto

---

Diva de Souza Andrade

---

Marisa Fabiana Nicolas

Londrina, 15 de fevereiro de 2007.

Ofereço ao meu marido, Xande, pelo amor e carinho sempre presentes.

Dedico à minha mãe, que é meu exemplo de força e determinação perante os percalços da vida...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, física ou moralmente para que fosse possível a realização deste trabalho e especialmente:

À minha família, principalmente minha mãe, pelo apoio e incentivo constantes que me auxiliaram muito nesta minha conquista.

À minha orientadora, Dra Mariangela Hungria, pela oportunidade de fazer parte do misterioso —mundo dos rizóbios“, pelo apoio, confiança, estímulo e principalmente pela amizade e disposição em solucionar todo tipo de problema, tanto científico como pessoal. Espero ter atingido suas expectativas, mas confesso que dei o melhor de mim neste momento.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da EMBRAPA, Lígia, Fernando, Pâmela, Maria, Marisa, Jesiane, Luciana, Daisy, Eliana, Adalgisa, Leandro, Eriana, Leny, Glaciela, Lílian, Michele, Emilene, Mirian, Susan, Alan, Adrian, Priscila, Fabinho, Fábio, Lucas, Renan 1, Renan 2, Nágila, Rinaldo e Dr. Rubens, pela amizade, carinho e pelo agradável convívio no laboratório nestes últimos 3 anos.

Aos membros da banca: Dra Márcia Cristina Furlaneto, Dr Fernando Gomes Barcellos, Dra Diva de Souza Andrade e Dra Marisa Fabiana Nicolás pela disponibilidade em participar da banca de defesa desta tese e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Microbiologia da UEL, pela divulgação do saber e conhecimento científico.

Às minhas companheiras de apartamento: Pâmela, Jesiane, Daliana e Verônica pela amizade e carinho cotidianos.

Aos meus amigos de todas as horas, Luis e Sandra, e meu afilhado João Pedro, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando nesta caminhada.

À UNIOESTE, pela minha liberação para cursar o Doutorado e pela compreensão na importância da realização deste trabalho.

Ao CNPq , pela concessão da bolsa de estudos.

À EMBRAPA Soja, pela estrutura que me foi concedida para a realização dos experimentos da tese.

"É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver."

*Gabriel García Márquez*

PINTO, Fabiana Gisele da Silva. **Genômica e diversidade de *Rhizobium Tropicici*, uma espécie tropical microssimbionte do feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris L.*)**. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). O rendimento médio nacional é bastante baixo, devido, principalmente, ao baixo nível de tecnologia empregado na cultura, ao cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, contudo, problemas relacionados à nodulação e fixação do N<sub>2</sub> com as estirpes nativas dos solos são relatados com freqüência. Neste trabalho foram conduzidos dois estudos, sendo que no primeiro foi realizada a caracterização de diversidade genética, pela avaliação de genes simbióticos e não simbióticos, de estirpes de *Rhizobium tropici*, com alta capacidade de fixação do N<sub>2</sub> em condições tropicais e isoladas de quatro regiões brasileiras. A técnica de PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S e 23S e a análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA permitiram a identificação de dois grupos, um relacionado às estirpes de *R. tropici* tipo A e outro às de *R. tropici* tipo B. A diversidade dos genes ribossomais foi elevada, indicando que as estirpes do tipo A podem representar uma nova espécie. Além disso, foi constatada diversidade genética intraespecífica elevada, pela análise por *rep*-PCR com os —primers“ BOX, ERIC e REP. Contudo, na análise de PCR-RFLP dos genes simbióticos, *nifH* e *nodC*, todas as estirpes de *R. tropici* apresentaram uma única combinação de perfis, o que pode refletir uma estratégia evolucionária dessas estirpes para a maximização da fixação de N<sub>2</sub>. No segundo estudo foi realizado o seqüenciamento e a bioprospecção parcial de genes da estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) de *R. tropici*, altamente eficiente no processo de fixação do N<sub>2</sub> e recomendada para o uso de inoculantes comerciais no Brasil. O genoma dessa estirpe foi estimado em 7,85 Mb, pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). Foram obtidas 2192 CDSs, sendo classificadas como válidas (1255), hipotéticas conservadas (668) ou hipotéticas (269). A estratégia de panorama genômico, para a obtenção de genoma parcial, mostrou-se viável e eficiente, uma vez que foram identificados genes putativos na maioria das classes funcionais dos bancos de dados KEGG e COG. Foram identificados genes do metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, bem como relacionados à biodegradação, quimiotaxia e, provavelmente, a mecanismos de infecção, com ênfase em genes relacionados aos sistemas de secreção dos tipos II e III. Além disso, foram identificados genes relacionados à capacidade competitiva, saprofítica e ao processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>. A estratégia de panorama genômico utilizada na estirpe PRF 81 indicou um mosaico de similaridade com diversos outros rizóbios. Além disso, foram identificados alguns genes promissores para manipulações futuras visando obter incrementos no processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>, não só com o feijoeiro, como em outras leguminosas.

**Palavras-chave:** Feijão. Nitrogênio - fixação. Rizóbio. Genética vegetal.

PINTO, Fabiana Gisele da Silva. **Genômica e diversidade de *Rhizobium Tropici*, uma espécie tropical microssimbionte do feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris L.*)**. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

### ABSTRACT

Brazil is the largest worldwide bean (*Phaseolus vulgaris L.*) producer and consumer. The average domestic yield is quite low, mainly due to the low level of technology employed in the crop, and to cultivation in low fertility soils, especially those that are poor in N. Consequently, an adequate supply of N provided by symbiosis with diazotrophic bacteria represents an alternative to increase domestic yield at low cost; however, problems related to nodulation and N<sub>2</sub> fixation with native strains in the soils are frequently reported. In this work, two studies were conducted: the first we performed a genetic diversity characterization, by evaluating symbiotic and non-symbiotic genes from *Rhizobium tropici* strains with high N<sub>2</sub> fixation capacity under tropical conditions, isolated from four Brazilian regions. The PCR-RFLP analysis for ribosomal genes 16S and 23S, and the sequencing analysis for gene 16S rRNA allowed two groups to be identified, one related to *R. tropici* type A and another to type B *R. tropici* strains. A high diversity of ribosomal genes was obtained, indicating that type A strains may represent a new species. In addition, high intraspecific genetic diversity was verified via rep-PCR analysis using BOX, ERIC, and REP primers. However, in the PCR-RFLP analysis for the symbiotic genes *nifH* and *nodC*, all *R. tropici* strains presented only one combination of profiles, which might reflect an evolutionary strategy of these strains to maximize N<sub>2</sub> fixation. In the second study, consisted in the sequencing and partial bioprospecting of genes of the *R. tropici* PRF 81 strain (=SEMIA 4080), highly effective in the N<sub>2</sub> fixation process and recommended to be used with commercial inoculants in Brazil. The genome of this strain was estimated at 7.85 Mb by the pulsed field gel electrophoresis technique (PFGE). We obtained 2192 CDSs, classified as valid (1255), conserved hypothetical (668), or hypothetical (269). The draft genome strategy to obtain partial genomic sequences proved viable and effective, since putative genes were identified in most functional classes of the KEGG and COG databases. Genes for the metabolism of amino acids, carbohydrates, and lipids were identified, as well as genes related to biodegradation, chemotaxis and, probably, infection mechanisms, with emphasis on genes related to type II and type III secretion systems. In addition were identified genes related to competitive and saprophytic capacity and to the N<sub>2</sub> biological fixation process. The draft genome strategy used for strain PRF 81 indicated a mosaic of similarity with several other rhizobia. In addition, some promising genes were identified for future manipulations aimed at obtaining increases in the N<sub>2</sub> biological fixation process, not only in bean plants, but in other legume.

**Keywords:** Phaseolus vulgaris. Rizobium. Plant genetics.

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
1 A Cultura do Feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	10
2 A Fixação Biológica do Nitrogênio.....	14
3 Taxonomia de rizóbios e microssimbiontes do feijoeiro.....	16
4 Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro.....	20
5 Técnicas moleculares utilizadas para analisar a diversidade de rizóbios .....	22
6 Estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa.....	26
7 Aspectos genéticos da FBN.....	30
7.1 Estrutura dos fatores de nodulação .....	30
8 Genomas de diazotrofos simbióticos.....	33
Referências .....	38
<b>ESTUDO 1</b> .....	53
Abstract.....	54
1 Introduction .....	55
2 Material and methods .....	57
2.1 Rhizobial strains .....	57
2.2 Morpho-physiological characterization.....	58
2.3 Genetic characterization .....	58
2.3.1 Extraction of total DNA .....	58
2.3.2 rep-PCR fingerprinting with BOX, ERIC and REP primers.....	58
2.3.3 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR-amplified DNA region coding for the 16S rRNA gene .....	59
2.3.4 RFLP-PCR of the DNA region coding for the 23S rRNA gene.....	60
2.3.5 RFLP-PCR of the DNA region coding for the <i>nifH</i> and <i>nodC</i> genes .....	60
2.3.6 Sequencing analysis of the DNA region coding for the 16S rRNA gene.....	60
2.3.7 Plasmid profiles .....	61
2.4 Data analyses .....	61
2.4.1 DNA profiles obtained in the rep-PCR and RFLP-PCR analyses.....	61
2.4.2 Analyses of the complete sequences of the 16S rRNA genes .....	61
3 Results .....	63
3.1 Morpho-physiological characterization.....	63

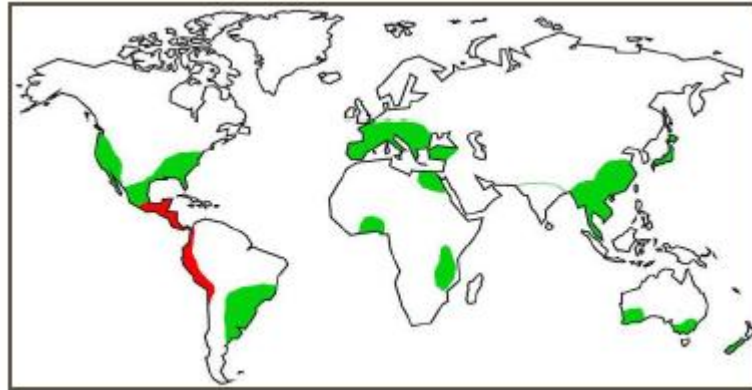
3.2 Analysis of combined BOX, ERIC and REP- PCR genomic fingerprints .....	63
3.3 RFLP-PCR of the 16S rDNA and 23rDNA regions.....	64
3.4 Phylogeny based on the 16S rRNA gene .....	65
3.5 RFLP-PCR of the DNA region coding for the <i>nifH</i> and <i>nodC</i> genes .....	65
3.6 Plasmid profiling .....	65
4 Discussion.....	66
Acknowledgments .....	69
References .....	70
Table 1 .....	79
Table 2 .....	80
Legend of figures.....	81
<b>ESTUDO 2</b> .....	90
1 Introdução.....	90
2 Objetivo .....	91
3 Material e Métodos.....	92
3.1 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	92
3.2 Extração do DNA genômico .....	93
3.3 Construção de bibliotecas “shotgun”.....	93
3.4 Seqüenciamento dos clones.....	94
3.5 Montagem e anotação automática de genes .....	94
3.6 Anotação manual.....	96
4 Resultados.....	97
4.1 Estimativa do tamanho do genoma da estirpe PRF 81 de <i>R. tropici</i> .....	97
4.2 Construção de bibliotecas.....	97
4.3 Seqüenciamento dos clones.....	98
4.4 Montagem e bioprospecção de genes .....	98
5 Discussão.....	101
6 Conclusões.....	109
7 Referências Bibliográficas.....	110
8 Tabelas e Figuras.....	117

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 A CULTURA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é a leguminosa em grão de consumo humano mais importante em escala mundial, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo considerada a "carne da população de baixa renda". Essa leguminosa participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina e na África e estima-se que, para cerca de 100 milhões de consumidores pobres, cuja dieta é baseada em amido, essa leguminosa representa a única fonte protéica. É considerado, por alguns nutricionistas, um alimento perfeito, pois apresenta, aproximadamente, o dobro do teor protéico da maioria dos cereais, é rico em fibras, carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina (COSTA; VIEIRA, 2000).

Há um consenso entre os estudiosos de que o feijoeiro é originário das Américas e apresenta centros de diversificação genética distintos. Análises baseadas em diversos critérios, como características morfológicas, padrões eletroforéticos de faseolina, isoenzimas e RFLP, sugerem a existência de três centros primários de diversidade genética: o centro Mesoamericano (México, América Central e Colômbia), o sul dos Andes, que abrange desde Peru até as províncias do noroeste da Argentina (GEPTS; BLISS, 1988; GEPTS 1990; BEEBE et al., 2001) e o norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia, Venezuela, Equador e norte do Peru (KAMI et al., 1995; AGUILAR et al., 2004). Além desses centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos. Atualmente, sua distribuição é cosmopolita, sendo encontrados representantes em todos os continentes (Figura 1). O gênero *Phaseolus* compreende, aproximadamente, 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o yearlong (*P. polyanthus*) (BROUGHTON et al., 2003).



**Figura 1** – Distribuição mundial do cultivo de *P. vulgaris*. As zonas de origem aparecem coloridas de vermelho e as áreas introduzidas de verde.

**Fonte:** Morón, (2004)

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos da humanidade. Eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo também, cultuados como símbolo da vida. Os antigos romanos usavam extensivamente feijões nas suas festas gastronômicas, utilizando-os até mesmo como pagamento de apostas. Foram encontradas referências aos feijões na Idade do Bronze, na Suíça, e entre os hebraicos, cerca de 1.000 a.C. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que os feijões eram o prato favorito dos robustos guerreiros troianos. A maioria dos historiadores atribui a disseminação dos feijões no mundo em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (EMBRAPA, 2005).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobadas nas estatísticas da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), publicadas em 2005, a produção mundial de feijão situou-se em torno de 18,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 26,9 milhões de hectares. Os países em desenvolvimento respondem por 89,2% da produção mundial e, entre os continentes, a Ásia é o maior produtor mundial, com 45,7%, seguida das Américas (36,7%), África (13,9%), Europa (3,4%) e Oceania (0,2%). Cerca de 66% da produção mundial foi oriunda de apenas sete países, tendo o Brasil como o maior produtor mundial dessa leguminosa. Na última década, a Europa diminuiu o consumo de feijão em cerca de 7%, enquanto neste mesmo período, os Estados Unidos aumentaram seu consumo na alimentação em 8 % (FAO, 2006). Este incremento pode ser devido a várias causas, dentre elas, a inclusão dessa leguminosa

como parte da oferta de pratos facilmente acessíveis em vias públicas e restaurantes de comida rápida e o surgimento de numerosas campanhas publicitárias, nas quais se recomenda incorporar a dieta proteínas de origem vegetal.

O Brasil é, hoje, o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com a safra 2006 estimada em 3,4 milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 16% da produção mundial de feijão. A área plantada cresceu 6,4%, e ocupa cerca de 4,2 milhões de hectares. A produtividade superou à da safra anterior em 6,5%, atingindo assim, o rendimento de 872 kg/ha<sup>-1</sup>. (CONAB, 2006).

O consumo *per capita* de feijão, na década de 70, era de 18,5 kg<sup>-1</sup> hab<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, já em 2005 baixou para 14 kg<sup>-1</sup> hab<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2005). Essa queda está intimamente associada a mudanças nos hábitos alimentares da população e as novas alternativas de alimentação mais rápida, como —fast food— muito apreciada, principalmente, pelos jovens de todo o mundo.

No Brasil, os grãos dessa leguminosa são largamente consumidos, representando de 20% a 28% das proteínas ingeridas pela população e o teor de proteína das sementes varia de 20 a 33%, sendo ainda, um alimento energético contendo cerca de 340cal/100g (EMBRAPA, 2005).

A importância social e econômica da cultura do feijoeiro para o Brasil (*Phaseolus vulgaris* L.) é evidenciada, principalmente, pelo contingente de pequenos produtores, que praticam agricultura familiar de baixa utilização de insumos. A produtividade do feijoeiro varia de menos de 500 kg ha<sup>-1</sup>, considerada muito baixa, para mais de 5.000 kg ha<sup>-1</sup> em condições experimentais (EMBRAPA, 2005; FAO, 2006) e, pela inoculação com estirpes eficientes, estão sendo relatados rendimentos de até 4.000 kg ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA et al., 2000, 2003). Desse modo, é relevante o potencial de utilização do processo de FBN para incrementar o rendimento médio nacional dessa leguminosa.

O baixo nível de tecnologia e o cultivo em solos marginais, devido ao baixo retorno econômico da cultura, contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro e, nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), representam um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos nacionais (ARAÚJO, 1994). Os teores de N nos solos brasileiros, de um modo geral, não são elevados e, com a intensificação da agricultura, as exigências nutricionais de N, são ampliadas, conseqüentemente, se faz necessário a reposição do N nestes solos. Neste contexto, o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) assume grande importância, porque além de ser uma tecnologia de baixo custo, representa uma alternativa para aumentar os

rendimentos nacionais e também contribui para a manutenção da fertilidade do solo e para a preservação ambiental de rios, lagos e lençóis freáticos pelo menor uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 1997).

## 2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Em termos globais, consideram-se a disponibilidade de água e dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) como os principais fatores limitantes à produção agrícola. Em caso de deficiência, a água precisa ser fornecida às culturas por meio de irrigação, enquanto o P deve ser suprido como fertilizante. O N é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e está presente na natureza como N molecular ( $N_2$ ), íons de nitrato ( $NO_3$ ), amônia ( $NH_3$ ) ou incorporado em compostos orgânicos nitrogenados. Depois do carbono (C) e do hidrogênio (H), o N é o elemento mais importante na constituição da matéria orgânica, representando de 8 a 16% do total. Esse elemento participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como, produção de ácidos nucleicos e proteínas. Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de  $N_2$  (80%), o N constitui, juntamente com a água, o principal fator limitante da produção agrícola mundial, pois nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do  $N_2$ , que é altamente estável e possui uma elevada energia de ativação (MANYANI et al., 2000).

As principais formas de disponibilização de N para o crescimento das plantas são: 1) N do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas bastante limitado, podendo ser esgotado rapidamente após alguns cultivos; 2) N fornecido pelos fertilizantes através da conversão do  $N_2$  em amônia, constitui a forma de assimilação mais fácil e com menor custo energético pelas plantas, porém, possui um elevado custo econômico e ambiental; 3) N fornecido pela fixação não-biológica, é resultante de processos naturais onde o  $N_2$  atmosférico é convertido em nitrato, principalmente através de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; e 4) N resultante do processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), denominado como FBN, é a principal via de incorporação do N à biosfera (HUNGRIA et al., 2001).

Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, mas a um custo elevado. O processo industrial que transforma o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) requer: 1. hidrogênio (derivado de gás de petróleo); 2. catalisador contendo ferro; 3. altas temperaturas (300° a 600°C); e 4. altas pressões (200 a 800 atm). Desse modo, o gasto de fontes energéticas não-renováveis é estimado em seis barris de petróleo por tonelada de  $NH_3$  sintetizada. Além disso, raramente a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é superior a 50% e a distribuição, armazenamento e aplicação dos fertilizantes

para as plantas demandam fontes energéticas (HUNGRIA et al., 1993, 1997, 2001). Estima-se que os fertilizantes nitrogenados sejam responsáveis por uma grande parte das emissões globais de gases de efeito estufa, bem como pela poluição de lagos e rios (GRAHAM; VANCE, 2003).

A FBN é um processo pelo qual os organismos, denominados de diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, são capazes de reduzir o  $N_2$  atmosférico à amônia, que é, posteriormente, utilizada para a síntese de compostos orgânicos nitrogenados. Esses microrganismos adquiriram durante sua evolução a capacidade de sintetizar o complexo enzimático da nitrogenase composto por duas proteínas diferentes, a dinitrogenase (Mo-Fe proteína) e dinitrogenase-redutase (Fe- proteína) que catalisa a conversão de  $N_2$  atmosférico à amônia, à custa de grande quantidade de energia (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

A contribuição mais relevante da FBN ocorre pela simbiose estabelecida entre algumas bactérias conhecidas, coletivamente, como rizóbios e plantas da família Leguminosae (Fabaceae nos E.U.A.). Em termos quantitativos, estima-se que 44 a 66 milhões de toneladas métricas de  $N_2$  são fixados por leguminosas de importância agrícola anualmente, com outros 3 a 5 milhões de toneladas métricas sendo fixados por leguminosas em ecossistemas naturais, fornecendo cerca de metade de todo o N usado na agricultura (GRAHAM; VANCE, 2003).

A FBN é um componente essencial para a sustentabilidade da agricultura, tanto que inoculantes rizobianos têm sido aplicados, frequentemente, como biofertilizantes. Contudo, trata-se de uma tecnologia barata, custo de U\$ 2-3  $ha^{-1}$  em simbiose com leguminosa e, globalmente, estima-se que a fixação não biológica contribua com cerca de 10% da entrada anual de N na Terra, enquanto a produção industrial contribui com 25%. Portanto, o processo biológico contribui com 65% da fixação anual de N, sendo o maior provedor desse nutriente para a manutenção da vida na Terra (HUNGRIA et al., 2001)

Os teores de N nos solos brasileiros são baixos, de modo que, para garantir o rendimento da cultura do feijoeiro, é necessário fornecer N através de fertilizantes e/ou maximizar o processo de fixação biológica do nitrogênio. Maximizar a contribuição do processo de FBN representa, portanto, uma alternativa de baixo custo, protetora do meio ambiente e com uma grande contribuição para o tipo de manejo que hoje é buscado mundialmente, o de uma agricultura sustentável (HUNGRIA et al., 1997, VARGAS; HUNGRIA, 1997).

### 3 TAXONOMIA DE RIZÓBIOS E MICROSSIMBIONTES DO FEIJOEIRO

A classificação taxonômica dos rizóbios foi, inicialmente, baseada em sua especificidade hospedeira, a qual, embora ambígua, tinha um aspecto prático pela sua utilidade para os usuários e fabricantes de inoculantes. Baseado essencialmente nesta especificidade, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como pertencentes à espécie *R. phaseoli* (FRED et al., 1932). A classificação posterior, proposta por Jordan (1984), levando em consideração características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dividiu as bactérias de crescimento lento e rápido em meio de cultura específico, resultou na divisão em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizonium*, respectivamente. O gênero *Rhizobium* foi subdividido em três espécies, *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. Este último foi então subdividido em três biovars, definidos com base na planta hospedeira que nodulam, *R. leguminosarum* bv. *viciae* que nodula ervilha, ervilhaca e fava (*Pisum sativum*, *Vicia sativa*, *V. fava*), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que nodula os trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, o feijoeiro. Posteriormente, mais quatro novos gêneros foram incluídos: *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; JARVIS et al., 1982; NOUR et al., 1994; LINDSTRÖM et al., 1995), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1998; de LAJUDIE et al., 1994), e *Allorhizobium* (De LAJUDIE et al., 1998).

Com o isolamento de novas bactérias e as metodologias de biologia molecular foi constatado que os rizóbios do feijoeiro apresentavam características fisiológicas e genéticas distintas, permitindo a sua divisão em dois grupos, denominados tipo I e tipo II, de acordo com diferenças nos plasmídeos simbióticos (pSym), com a presença ou ausência de reiterações (múltiplas cópias) de genes ligados à fixação de nitrogênio e a capacidade de nodular outros hospedeiros (MARTÍNEZ et al., 1985; FLORES et al., 1987; BROM et al., 1988). Inicialmente acreditava-se que a presença destas reiterações representasse uma vantagem evolutiva para *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (MARTÍNEZ et al., 1985; ROMERO et al., 1988), no entanto, posteriormente verificou-se que estão relacionadas à constante variabilidade de diversos fenótipos (SOBÉRON-CHAVES et al., 1986; FLORES et al., 1988). As estirpes do tipo I possuem múltiplas cópias dos genes *nifH* e, acreditava-se, possuíam um círculo restrito de hospedeiras, centralizado no feijoeiro, enquanto que as estirpes do tipo II possuem uma única cópia destes genes e eram capazes de nodular também *Leucaena* spp (MARTÍNEZ, et al., 1985; BROM et al., 1988). Foi observado que estes grupos apresentavam diferenças na estrutura de seus polissacarídeos extracelulares (GIL-SERRANO et al., 1990) e,

posteriormente, verificou-se que o círculo de hospedeiras destas espécies era bem menos restrito e definido do que se acreditava (HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995).

Martínez-Romero e colaboradores em 1991, reclassificaram as estirpes do tipo II em *R. tropici* a partir de uma caracterização genotípica baseada no sequenciamento parcial do 16S rRNA, hibridização DNA-DNA e organização do DNA ribossomal. Dois subgrupos, IIA e IIB, foram descritos para esta espécie de modo a acomodar o baixo nível de homologia de DNA (36%) e diferenças em características fenotípicas e genotípicas, diferenças estas, que foram enfatizadas, pela presença de um megaplasmídeo específico em cada grupo (GENIAUX et al., 1995). As bactérias pertencentes a essa nova espécie foram isoladas de regiões tropicais, nodulam e fixam N<sub>2</sub> com *P. vulgaris*, *Leucaena esculenta* e *L. leucocephala*, são aeróbias, Gram-negativas, com pH ótimo para crescimento variando entre 5 e 7, crescendo em temperatura de até 40°C.

A estirpe CFN 299 foi designada como estirpe padrão *R. tropici* tipo IIA que apresenta como características a necessidade de cálcio para crescimento em meio PY, não crescem em meio LB, são imóveis em meio contendo 0,3% de ágar e a temperatura máxima de crescimento é de 35 a 37°C e apresenta 4 plasmídeos com tamanho aproximado de 150, 185, 510 e acima de 1000 Kb. Entretanto, as estirpes do tipo IIB, representadas pela CIAT 899, não requerem cálcio para crescimento, crescem em meio LB, são móveis em meio 0,3% de ágar, sua temperatura máxima de crescimento é de 40°C, e também são mais resistentes a antibióticos e metais pesados (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991), apresentam maior tolerância à acidez (GRAHAM et al., 1994) e a temperaturas elevadas (HUNGRIA et al., 1993; MERCANTE et al., 1998) do que as do tipo IIA e apresentam 3 plasmídeos com tamanho aproximado de 185, 510 e 1700 Kb.

Posteriormente, a espécie *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993) foi descrita incluindo as estirpes anteriormente classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli do tipo I de origem americana (MARTÍNEZ et al., 1988), os quais constituem um biovar, *R. etli* bv. phaseoli, e isolados não simbióticos originários do México (SEGOVIA et al., 1991). O sequenciamento parcial do 16S rRNA foi utilizado para diferenciar *R. leguminosarum* de *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), sendo que atualmente somente são consideradas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli as estirpes que estiverem estreitamente relacionadas com os genes cromossomais dos outros biovars (bv. trifolii e bv. viceae) desta espécie (LINDSTRÖM et al., 1995). A estirpe padrão de *R. etli* bv. phaseoli é a CFN 42 (= USDA 9032) que nodula *Phaseolus vulgaris*, foi descrita como sendo aeróbia, Gram-negativa, com temperatura máxima de crescimento de 35°C, não apresenta crescimento em meio LB nem em

meio PY com cálcio e é sensível aos antibióticos carbenicilina, espectinomicina, cloranfenicol ou rifampicina. Todas as estirpes desse grupo são resistentes ao ácido nalidíxico e são distingüíveis das outras espécies em nível molecular pelos resultados de teste de hibridização do DNA total, perfis enzimáticos de eletroforese e seqüências de genes ribossomais (SEGOVIA et al., 1993).

Os limites interespecíficos entre *R. leguminosarum* e *R. etli* são bastante flexíveis. O nível de homologia de DNA (45%) e a homologia entre várias regiões cromossômicas, tais como para os genes que codificam para lipopolissacarídeos, observada para as duas espécies (LAGUERRE et al., 1993), sugerem que possam ter ocorrido transferências gênicas e recombinações entre estas duas espécies (AMARGER et al., 1997). Além disso, os genes dos plasmídeos simbióticos destas duas espécies são homólogos e organizados similarmente (VÁSQUEZ et al., 1991). Acredita-se que *R. leguminosarum* bv. phaseoli possa ter surgido através da transferência horizontal do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum* (SEGOVIA et al., 1993). Seja qual for sua origem, estas duas espécies mostram-se mais proximamente relacionadas do que os dois subgrupos de *R. tropici*.

A partir de uma análise da seqüência total do 16S rRNA verificou-se que *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. tropici* formam um grupo monofilético coerente, o qual também inclui uma linhagem independente contendo um único isolado de nódulos de feijoeiro (Van BERKUM et al., 1996) e *Rhizobium rhizogenes*, a qual é proximamente relacionada a *R. tropici* (WILLEMS; COLLINS, 1993). *R. tropici* foi originalmente isolado de *P. vulgaris* e *Leucaena* em solos ácidos do Cerrado brasileiro (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; MERCANTE et al., 1998). Uma vez que tanto o feijoeiro quanto a leucena são plantas introduzidas nas regiões do Cerrado, acredita-se que *R. tropici* fosse originalmente simbiote de alguma outra leguminosa destas regiões. Esta espécie foi recuperada de nódulos de *Bolusanthus* e *Spartium* (DAGUTAT; STEIN, 1995) em solos africanos, tendo sido isolada de feijoeiro em solos do Kenya (ANYANGO et al., 1995). Uma hipótese para sua dispersão em solos africanos teria sido a sua introdução pelos portugueses juntamente com as sementes do feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO; CABALLERO-MELLADO, 1996).

*R. Tropici* foi recuperado de nódulos de feijoeiro em três diferentes localidades da França, em áreas caracterizadas como de solos arenosos e ácidos (AMARGER et al., 1994). Isolados bastante diversos e eficientes de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro tem sido detectados em solos africanos sem nenhum histórico de cultivo anterior ou inoculação (ANYANGO et al., 1995). Além disso, em solos franceses foram detectados quatro grupos distintos de rizóbio nodulando o feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. phaseoli

(LAGUERRE et al., 1993), *R. tropici* (AMARGER et al., 1994) e *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997). Embora o feijoeiro não seja originário

da Europa Ocidental, continente que possui um histórico de cultivo de cerca de 500 anos, a grande diversidade de microsimbiontes existentes nestes solos sugere que, *Rhizobium* spp capaz de nodular o feijoeiro, são pré-existentes nestas regiões, o que explicaria a rápida disseminação da cultura na Europa (STRALIOTTO; TEIXEIRA, 2000).

No Brasil, três espécies distintas de rizóbio são de reconhecida importância como microsimbiontes do feijoeiro, *R. Leguminosarum* bv. phaseoli, *R. etli* e *R. tropici*. Diversas espécies de rizóbios, assim como, estirpes isoladas de leguminosas florestais foram relatadas como capazes de nodular esta planta, embora não se conheça sua importância ecológica, uma vez que resultam de experimentos de inoculação artificial em laboratório e não de ocorrência natural em nível de campo (EARDLY et al., 1985; BROMFIELD; BARRAN, 1990; SADOWSKY et al., 1988; BAL et al., 1982; HERRERA et al., 1985; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al., 1993; THOMAS et al., 1994; HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995; GRANGE; HUNGRIA, 2004).

Apesar da grande disponibilidade de dados genotípicos na literatura a cerca dos rizóbios, devido ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular nos últimos anos, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições primordiais para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas.

Atualmente, a taxonomia dos rizóbios se desenvolve rapidamente e nos últimos anos várias espécies novas têm sido descritas, e a aplicação de métodos de biologia molecular na taxonomia, tem ajudado a definir os novos rizóbios. A taxonomia atual se baseia em um enfoque polifásico, que inclui caracterizações de morfologia, bioquímica, fisiologia, genética e filogenia, entre outras, além disso, este enfoque polifásico tem conferido a taxonomia uma base mais natural e confiável. Estima-se, que os rizóbios ainda não conhecidos representem um magnífico recurso biológico, ainda inexplorado, e as leguminosas são um dos maiores e mais diverso grupo de plantas, e se encontram distribuídas em distintos ecossistemas. Até hoje, foram investigados apenas os microsimbiontes de um pequeno número dessas leguminosas e seguramente novos rizóbios serão conhecidos a medida que se caracterizar mais isolados (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000).

#### 4 DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS QUE NODULAM O FEIJOEIRO

O feijoeiro é considerado um hospedeiro promíscuo com relação ao rizóbio, uma vez que, uma grande diversidade de espécies pode formar associações mais ou menos eficiente com esta planta (MERCANTE et al., 1998). Considerando-se a baixa eficiência de uso do fertilizante nitrogenado pela cultura do feijoeiro e os problemas ambientais ocasionados pelo excesso de sua utilização, a fixação biológica de nitrogênio assume uma importância ainda mais evidente, representando a alternativa mais viável para o fornecimento de nitrogênio à cultura. Assim, o suprimento de nitrogênio à cultura via fertilizante mineral exige aplicações cada vez mais freqüentes e, conseqüentemente, representa um aumento significativo nos custos de produção. Entretanto, em muitos casos, tem-se observado baixa freqüência de resposta à inoculação do feijoeiro em condições de campo, que tem sido atribuída à susceptibilidade de ambos os parceiros simbióticos a estresses ambientais, como deficiência hídrica e temperatura elevada do solo (MARTÍNEZ- ROMERO et al., 1991; MERCANTE, 1993; HUNGRIA et al., 1993), ao ataque de pragas e doenças, ao ciclo curto da cultura (HARDARSON, 1993) e à baixa competitividade das bactérias inoculadas em relação às estirpes de rizóbio nativas dos solos (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; THIES et al., 1991; MERCANTE et al., 1998).

Acredita-se que o principal fator limitante à FBN resida na população nativa de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro encontrada nos solos brasileiros que, na maioria das áreas, é elevada, competitiva, mas com baixa capacidade de FBN e, sendo dificilmente deslocada pelos métodos tradicionais de inoculação, dificulta o estabelecimento de estirpes superiores (GRAHAM, 1994; HUNGRIA et al., 1997, 2003; ANDRADE et al., 2002). Vários fatores podem ser citados como responsáveis pela superioridade das estirpes nativas, desde a questão numérica (THIES et al., 1991) até as capacidades de mobilidade no solo, de quimiotaxia em direção aos exsudatos da planta, a taxa de crescimento em substratos de solo, a presença de determinados polissacarídeos de superfície celular, a produção de toxinas, a velocidade de infecção das raízes, entre outros, além de diversos fatores abióticos, como por exemplo, a acidez do solo (HUNGRIA et al., 1997; HUNGRIA; VARGAS, 2000).

O conhecimento sobre a diversidade dos rizóbios capazes de nodular o feijoeiro em solos brasileiros ainda é pequeno, contudo, nos poucos estudos conduzidos tem-se constatado grande variabilidade fenotípica e genotípica entre as estirpes, inclusive com variabilidade elevada quanto à eficiência no processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN)

(HUNGRIA et al., 1993; MERCANTE et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999; MOSTASSO et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004; ALBERTON et al., 2006; KASCHUK et al., 2006).

Atualmente, entre as espécies descritas capazes de nodular e fixar nitrogênio em feijoeiros, incluem-se: *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984), *R. tropici* (MARTÍNEZ- ROMERO et al., 1991), *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997). O conhecimento de que *R. tropici* apresenta maior estabilidade genética, pela menor reiteração dos genes *nif*, surgiu como a solução para a obtenção de estirpes que apresentassem menor alteração das características simbióticas (FLORES et al., 1988; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). A partir de um programa de seleção de estirpes baseado na diversidade de rizóbios nativos, realizado pela Embrapa Soja e pelo IAPAR, foi possível a identificação da estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium tropici*. Em diversos ensaios de campo contendo populações elevadas de estirpes nativas, estimadas em  $10^3$ - $10^6$  células  $g^{-1}$  de solo, a inoculação com a PRF 81 resultou em incrementos no rendimento de até 900 kg  $ha^{-1}$ , o que conduziu a sua recomendação para o uso em inoculantes comerciais desde 1998 (HUNGRIA et al., 2000). A difusão dos resultados obtidos com a PRF 81 aos agricultores e extensionistas também expandiu a comercialização de inoculantes para a cultura do feijoeiro, com um incremento da ordem de 25% (HUNGRIA et al., 2003).

Neste sentido, a recomendação de inoculantes para o feijoeiro com estirpes de *R. tropici* tem contribuído significativamente para o aumento da fixação de N nessa cultura, uma vez que, apresentam estabilidade genética cerca de 1000 vezes superior às demais espécies, além de outras características agronomicamente importantes para as condições dos solos tropicais, como tolerância a temperaturas elevadas, toxidez de alumínio, acidez elevada e tolerância a altos níveis de antibiótico (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991).

Contudo, a recomendação generalizada de inoculante para o feijoeiro com as mesmas estirpes de rizóbio para todas as regiões do país, independente dos cultivares utilizados e das condições ambientais locais, tem ocasionado ampla variabilidade de resposta à inoculação em condições de campo, demonstrando, freqüentemente, limitações do potencial simbiótico nesta interação.

## 5 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA ANALISAR A DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS

Durante os últimos vinte anos foram descritas muitas espécies e gêneros novos de bactérias, devido principalmente, ao desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares que permitem realizar estudos precisos da variabilidade genética de microrganismos (ROSADO et al., 1999) e tem incrementado o número de espécies de rizóbios isoladas, bem como, o número de leguminosas identificadas com potencial para a agricultura (SESSITSCH et al., 2002). As técnicas moleculares têm se revelado como uma importante ferramenta nos estudos de taxonomia e filogenia, uma vez que permite o acesso a biodiversidade das espécies bacterianas.

Os estudos moleculares disponibilizam informações refinadas, que permitem o entendimento de grupos funcionais de microrganismos e, especialmente, suas relações com ambientes e condições particulares (SCHLOTTER et al., 2000).

Os estudos de inferência filogenética dos rizóbios podem ser baseados em três critérios principais. Primeiro, nos genes cromossomais do genoma básico, para localizar sua posição filogenética, através da análise de genes comuns e conservados em todas as bactérias (como os genes ribossomais 16S, 23S), a fim de estimar sua posição no domínio Bacteria. Segundo, na filogenia dos genes de fixação do nitrogênio, disponibilizando informações acerca das relações entre os rizóbios e outras bactérias fixadoras de nitrogênio, que é uma característica ancestral de amplo espectro filogenético. E, terceiro, na filogenia dos genes de nodulação, que são excelentes marcadores da coevolução dos rizóbios com seu hospedeiro, assim como, de sua origem geográfica (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Atualmente, a análise de seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S rDNA foi estabelecida como padrão de análise em estudos de taxonomia e filogenia (HEYNDRICKX et al., 1996; GARRITY; HOLT, 2001; KRIEG, 2001). A conservação dos genes rRNA, devido à sua função estrutural nos ribossomos, e a existência de variabilidade em alguns domínios torna as seqüências desses genes ideais para comparação de organismos e inferência filogenética (WEISBURG et al., 1991; GARRITY; HOLT, 2001). Comparações entre as seqüências de nucleotídeos completas ou parciais do gene *rrs* (16S rRNA) tem sido amplamente utilizadas para avaliara as relações filogenéticas entre muitas espécies de rizóbios (YOUNG et al. 1991; EARDLY et al., 1992; LAGUERRE et al., 1993; AMARGER et al.,

1997; VINUESA et al. 1998; CHUEIRE et al., 2000; LAFAY et al., 2001; MOSTASSO et al., 2002; CHUEIRE et al., 2003; GRANGE; HUNGRIA, 2004; YOUNG et al., 2004; SILVA et al., 2005; VINUESA et al., 2005ab; MENNA et al., 2006).

Com o objetivo de se comparar e refinar as análises filogenéticas dos rizóbios construídas baseadas no gene 16S rRNA, outros genes conservados, vem sendo utilizados, como o gene *rml* que codifica para 23S rRNA (TESFAYE et al., 1997; TEREWORK et al., 1998; PALAWSKA et al., 2000; VAN BERKUM et al., 2003), os genes *glnA* e *glnII* (TURNER et al., 2000; SILVA et al., 2005) que codificam para as enzimas glutamino sintetase GSI e GSII respectivamente, *atpD* (LUDWIG et al., 1998; SILVA et al., 2005; VINUESA et al., 2005a) que codifica para a subunidade  $\beta$  da ATP sintetase, *recA* (GAUNT, et al., 2001; VINUESA et al., 2005a) que codifica para a proteína responsável pela recombinação homóloga em bactérias, *dnaK* (STEPKOWSKI et al., 2003; EARDLY et al., 2005) que codifica para uma chaperona envolvida em vários processos celulares e *rpoB* (MOLLET et al., 1997; KHAMIS et al., 2003) que codifica para a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase. O agrupamento filogenético dos rizóbios com estes genes cromossomais coincide com a filogenia inferida a partir do gene 16S rRNA na topologia dos principais clados, mas podem ser observadas diferenças ao nível intragenérico (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Outras metodologias também podem ser utilizadas para avaliação da diversidade genética de rizóbios como, por exemplo, uma variação da técnica de PCR, baseada no uso de iniciadores correspondentes a seqüências repetitivas e conservadas dispersas em locais característicos do genoma procariótico. Essas seqüências quando associados à amplificação do DNA pela técnica de PCR geram marcadores moleculares e genômicos altamente específicos, além de reprodutíveis, diferenciando espécies e, até mesmo, estirpes, com ótima precisão (DE BRUJIN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994; LAGUERRE et al., 1994; LAGUERRE et al., 1996; SELENSKA-POBELL et al., 1996; RADEMAKER et al., 1998; SANTOS et al., 1999; CHEN et al., 2000; MOSTASSO et al., 2002; GALLITERASAWA et al., 2003; GRANGE; HUNGRIA, 2004; ALBERTON et al., 2006; KASCHUK et al., 2006). Existem três famílias de elementos repetitivos para este tipo de análise, incluindo a seqüência REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (35-40 pb), a seqüência ERIC (*Enterobacterial Repetive Intergenic Consensus*) (124-127 pb) e os elementos BOX (43-50 pb). As seqüências repetitivas parecem estar localizadas em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações, e os iniciadores podem ser sintetizados a partir de repetições invertidas desses elementos, e então um único iniciador

pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (VERSALOVIC et al., 1994; RADEMAKER et al., 1998; KIM et al., 2001; LIU et al., 2005).

Outra técnica que também pode ser utilizada para em estudos de relações filogenéticas é a eletroforese em gel de campo alternado (*Pulsed Field* - PFGE). Nesta técnica, utiliza-se campos elétricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção. Esta separação é baseada no maior tempo que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo do pulso (duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção). Por ser uma técnica reprodutível e com muito bom poder discriminatório, tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos e na distinção de isolados clínicos. As suas limitações resultam do fato de ser uma técnica que exige experiência na sua aplicação, e que é dispendiosa e demorada, principalmente devido ao tratamento da amostra, já que a extração de DNA das células exige cuidados especiais para que a quebra mecânica do DNA não afete a sua reprodutibilidade. Além disso, esta metodologia pode ser empregada também para se estimar o tamanho do genoma de organismos, como por exemplo, em *A. tumefaciens* (SUZUKI et al., 2001) entre outros.

Outra metodologia de investigação das relações filogenéticas de rizóbios é a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica utiliza enzimas de restrição, que reconhecem de 4 a 5 pb, e fragmentam o DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos, desde que haja distinção entre as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA. Quando é utilizada para gerar fragmentos de restrição em genes ribossomais amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) esta técnica também é chamada de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), (LAGUERRE et al., 1996; VINUESA et al., 1998; DIOUF et al., 2000; THIES et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA et al., 2004, BATISTA et al., 2006). Pode-se dizer que é uma poderosa ferramenta para se estudar a diversidade genética intraespecífica, fornecendo uma análise complementar à caracterização prévia por outras metodologias (GRANGE; HUNGRIA, 2004; ALBERTON et al., 2006).

O genoma dos rizóbios apresenta um único cromossomo e pode conter um número variável de plasmídeos, sendo que os genes envolvidos nas diferentes etapas do processo de nodulação, nod, nol e noe, na maioria das vezes, estão contidos em um único plasmídeo simbiótico (*pSym*) (HUGHES, 2000). Os demais plasmídeos são denominados de

crípticos e estão relacionados à capacidade de sobrevivência dos rizóbios no solo (AMARAL et al., 1995), a biossíntese de polissacarídeos de superfície, bem como para a nodulação e capacidade competitiva (BROME t al., 2002). As estirpes de *Rhizobium*, normalmente apresentam de um a seis plasmídeos, que podem representar até 25% do genoma total da bactéria (BROM et al., 2002). Eckhardt (1978) desenvolveu a técnica para separação de plasmídeos e DNA cromossomal por eletroforese em gel de agarose e esta vem sendo adaptada por diversos autores. Sobretudo, entre inúmeras utilizações da técnica, tem-se o estudo da diversidade de rizóbios de feijoeiro, através dos perfis de plasmídeos (ANDRADE et al., 2002). A estirpe *R. etli* CFN 42 contém seis plasmídeos (p42a a p42f) variando de 150 a 600 kb e é utilizada em muitos estudos, por exemplo, por Brom et al. (2002). O plasmídeo p42d (390 kb) corresponde ao plasmídeo *pSym*, o p42b carrega seqüências requeridas para a biossíntese de lipossacarídeos e para o estabelecimento da simbiose; o p24a é um plasmídeo autotransferível, indispensável para a mobilização do plasmídeo *pSym* e o p42f, contém os genes *fixL* e *fixNOQP* (BROM et al., 2002).

Baseado nesse contexto, para o melhor posicionamento filogenético de estirpes de rizóbios, é recomendada a utilização de análise polifásica, ou seja, que sejam considerados de dois a três parâmetros de análises (LAGUERRE et al., 2001). Os métodos que demonstraram maior confiabilidade dos resultados foram o seqüenciamento do gene 16S rRNA e também de outros genes cromossomais, a amplificação com primers específicos pela PCR e a fragmentação de DNA por enzimas de restrição pela técnica de RFLP. Contudo, para que FBN traga maiores benefícios para a cultura do feijoeiro é necessário que maiores estudos sejam realizados quanto a diversidade das estirpes brasileiras, envolvendo parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos e que dentro desta diversidade possam ser identificadas estirpes mais competitivas, mais estáveis geneticamente e com maior capacidade de fixação de nitrogênio.

## 6 ESTABELECIMENTO DA SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA

Os rizóbios são um grupo heterogêneo de bactérias classificadas em quatro famílias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* e *Bradyrhizobiaceae* (GARRITY; HOLT, 2001). De todos os gêneros englobados nestas famílias, somente *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* são capazes de estabelecer simbiose com as leguminosas.

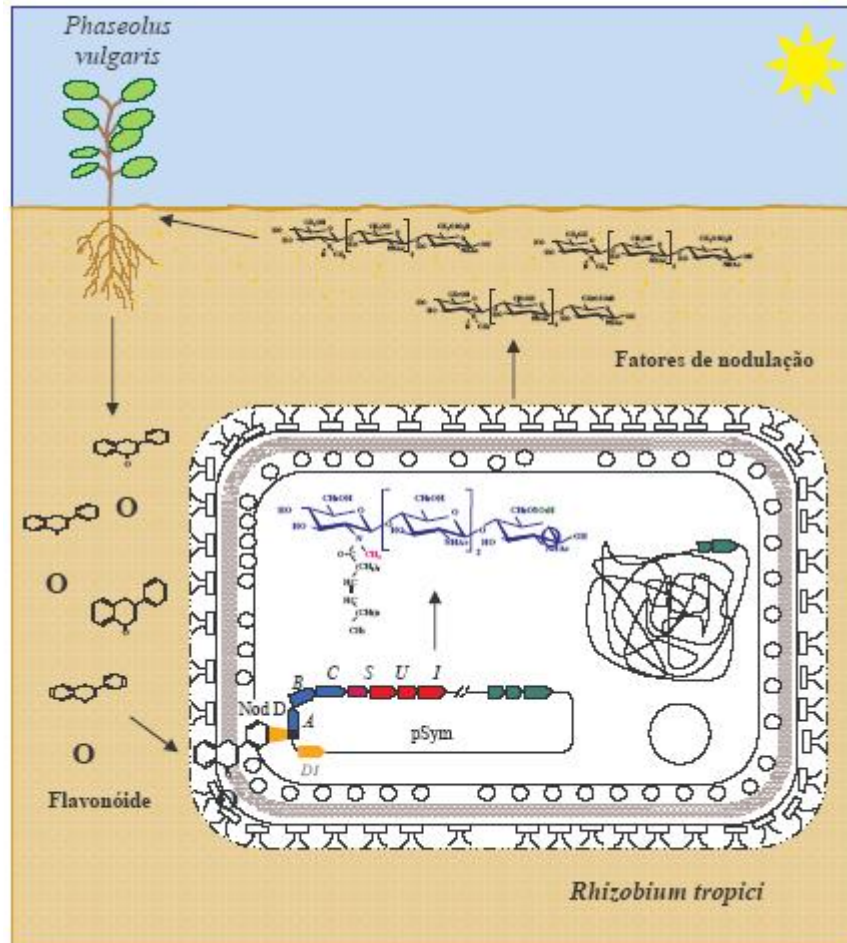
A interação simbiótica rizóbio-leguminosa inicia-se com a formação de um novo órgão na raiz da planta, denominado de nódulo, cujo no seu interior, posteriormente, irá ocorrer a FBN. A grande complexidade do processo está nas numerosas trocas de sinais moleculares entre a bactéria e a planta durante a infecção, desenvolvimento e funcionamento dos nódulos com aproximadamente, 100 genes bacterianos e da planta envolvidos neste processo (VANCE, 2002).

A formação dos nódulos é um processo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira quanto na bactéria. As alterações na bactéria visam, especialmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor, necessários para o processo da fixação biológica, enquanto as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1994).

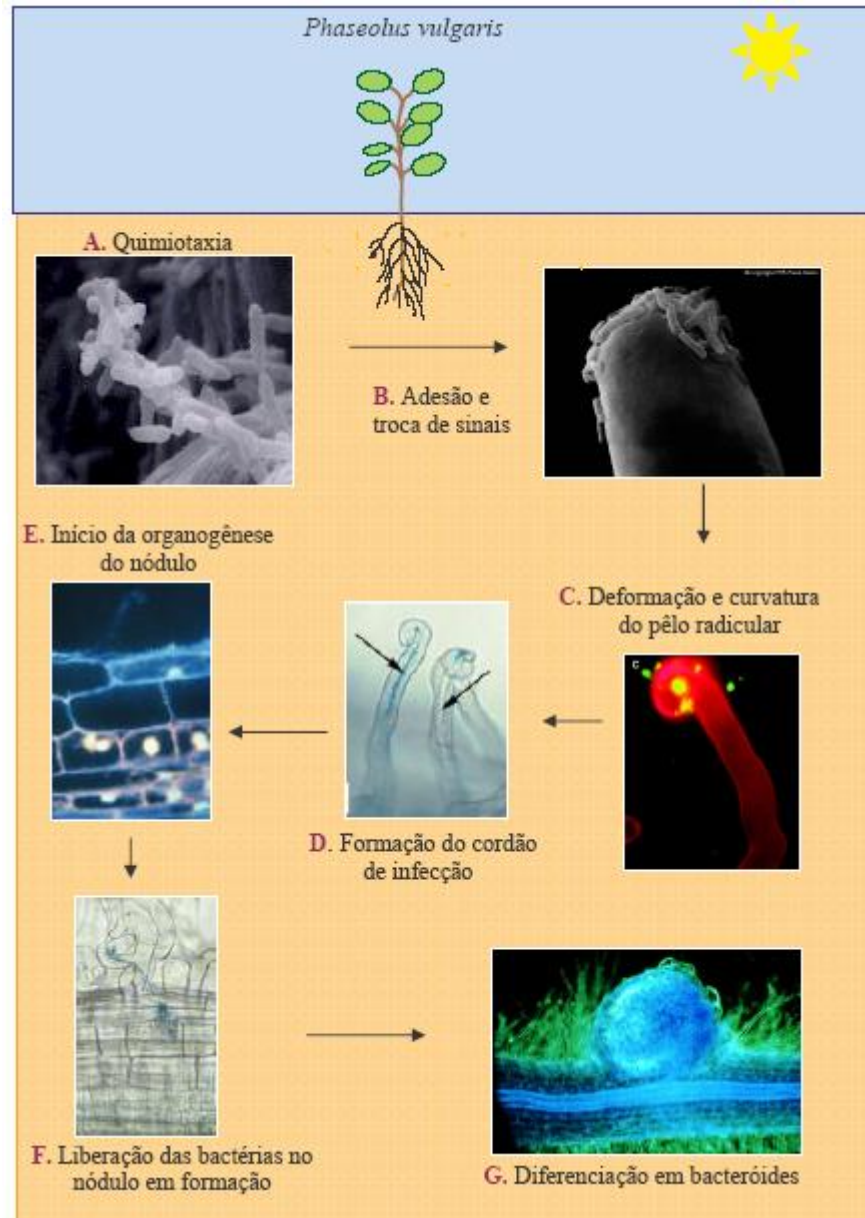
O estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa inicia-se com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos de ação quimiotática sobre o rizóbio (HUNGRIA et al., 1997), facilitando a colonização rizosférica e estimulando o crescimento da bactéria (HUNGRIA; STACEY, 1997). Geralmente, estes compostos excretados são açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos que promovem a adesão dos rizóbios aos pêlos radiculares das plantas, num processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: Na primeira etapa, as bactérias isoladas se aderem às que estão presas aos pêlos radiculares (HUNGRIA et al., 1997) e simultaneamente a esta à adesão, tem início uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, que libera compostos fenólicos, geralmente flavonóides, e também quaternários de amônia denominados coletivamente de betaínas, que são responsáveis pela indução de transcrição de genes bacterianos, essenciais à nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*) (BRENCIS; WINANS, 2005). Ainda nesta etapa, as lectinas das plantas hospedeiras servem como receptores para os exopolissacarídeos (EPS) bacterianos e são moléculas que desempenham um importante papel

no estabelecimento da simbiose rizóbio- leguminosa (HIRSCH, 1999; BRENCIS; WINANS, 2005). Na segunda etapa de troca de sinais moleculares (Figura 2), os rizóbios produzem sinais específicos para cada planta hospedeira, por meio dos genes de nodulação, conduzindo a produção dos fatores de nodulação, ou fatores Nod, que são oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) que induzem modificações radiculares no estágio de pré-infecção, como: formação de raízes curtas e grossas, deformação, encurvamento e aumento no número dos pêlos radiculares, seguido por invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pêlo radicular. Associado com a infecção ocorre a indução de divisão celular nas células do córtex e a formação do primórdio nodular, cujo desenvolvimento dá origem ao nódulo (PICHON et al., 1992) (Figura 3). A partir do estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se diferenciarem em bacteróides, formas capazes de fixar  $N_2$ . Quando o nódulo está formado, são sintetizadas as enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do N e com a assimilação do N fixado inicia-se o processo de FBN.

Essa interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre o rizóbio e a planta hospedeira, pois a sinalização molecular, através dos flavonóides e dos fatores Nod, é altamente específica e coordenada (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998). Entretanto, o grau de especificidade varia muito em função do rizóbio e da leguminosa considerados. A prosmicuidade simbiótica não está associada com nenhum grupo taxonômico em particular, mas está amplamente distribuída na natureza (PERRET et al., 2000).



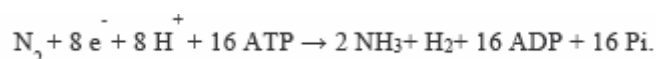
**Figura 2** – Intercâmbio de sinais específicos entre os simbiosites.



**Figura 3** – Estabelecimento da simbiose entre rizóbio e leguminosa. (Micrografias cedidas por Belén Moron)

## 7 ASPECTOS GENÉTICOS DA FBN

Os rizóbios são capazes de reduzir o N<sub>2</sub> a amônia, além de outros compostos devido a presença de um complexo enzimático denominado dinitrogenase, que é formado por duas unidades protéicas: a Ferro-proteína (Fe-proteína) codificada pelo gene *nifH* e que coleta a força redutora e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína) codificada pelos genes *nifD* e *K*, que coleta e reduz o substrato. Durante o processo de redução do N<sub>2</sub>, a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferredoxina, responsável pela transferência de um elétron para a unidade Fe-proteína que, então, reduzida, doa um elétron para a MoFe-proteína, que acumula os elétrons. O processo ocorre até que oito transferências de elétrons sejam acumuladas, possibilitando a redução completa do N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>. Estes oito elétrons são necessários porque, obrigatoriamente, também ocorre a redução de prótons de hidrogênio (H<sup>+</sup>) a H<sub>2</sub>. A reação pode ser assim expressa:



Por ser um processo de alta demanda energética, há um rigoroso controle genético do metabolismo da FBN através dos genes de fixação, *nif* e *fix*. Em *Rhizobium*, a síntese da nitrogenase é codificada pelos genes estruturais *nifD*, *K* e *H* que estão organizados em “cluster” e encontram-se em um único plasmídeo simbiótico (BECKING, 1992; WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003).

### 7.1 ESTRUTURA DOS FATORES NODULAÇÃO

Os fatores de nodulação (fatores Nod) desempenham um papel fundamental no início do desenvolvimento do nódulo e na invasão bacteriana (BROUGHTON et al., 2000; PERRET et al., 2000; D'HAENZE; HOLSTERS, 2002). Em resposta ao sinal liberado pela planta (flavonóides, betaínas e ácidos aldônicos), os rizóbios sintetizam os factores Nod, dirigidos à planta hospedeira (DAKORA, 2003). Os genes bacterianos envolvidos na biossíntese e excreção dos fatores Nod são denominados de genes de nodulação. Inicialmente se denominaram como genes *nod*, mas como o número seguia crescendo se utilizaram outras designações como *nol* e *noe*. Na maioria das espécies de rizóbios, estes genes se encontram

localizados em um plasmídio simbiótico (pSym), como em *R. tropici*. Já em outras espécies como *B. japonicum* ou *M. loti*, estes genes se localizam no cromossomo (DOWNIE, 1998).

O processo de ativação dos genes de nodulação envolve reguladores transcricionais da família “LysR-like”, conhecidos como NodD e que se expressam constitutivamente. A proteína NodD se liga a seqüências altamente conservadas de 47 pares de bases (pb) encontradas nas regiões promotoras dos genes de nodulação, denominadas “caixas *nod*” (PERRET et al., 2000), além de interagir com os sinais moleculares da planta e coordenar a transcrição de demais genes de nodulação, responsáveis pela síntese dos fatores implicados na formação do nódulo. Todos os rizóbios capazes de nodular efetivamente apresentam múltiplas cópias do gene *nodD*. *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *Rhizobium* sp. NGR234 contém três e duas cópias, respectivamente (LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998). *R. etli* apresenta três cópias e *R. tropici* IIA CFN 299 e IIB CIAT 899 contém 5 cópias (Van RHIJIN et al., 1995).

A síntese do esqueleto básico do fator Nod é constituído por 3 a 5 moléculas de N- acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por ligações  $\beta$ -1,4, codificado pelos genes *nodABC*, presentes em todos os rizóbios até hoje investigados e, por esse motivo, denominados genes *nod* comuns, juntamente com o gene regulador *nodD*. Moléculas de N-acetilglucosamina sintetizadas pela bactéria são polimerizadas mediante a atividade transferase da proteína NodC. A proteína NodA promove a transferência de um grupo acil ao grupamento amina livre gerado na extremidade não redutora enquanto a proteína NodB age na desacetilação do resíduo de N-acetilglucosamina da extremidade redutora do fator Nod (MANYANI, 2000). A estrutura básica do fator Nod pode sofrer modificações químicas tanto no seu extremo redutor quanto no não redutor, sendo mais freqüentes modificações como sulfatação metilação, acetilação e fucosilação, que podem variar em cada espécie e biovar de rizóbio (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005). A síntese e transferência de grupos químicos são determinadas por genes conhecidos como *hsn* (host specific *nodulation*), ou genes de nodulação específicos do hospedeiro (SCHULTZE; KONDOROSE, 1998; BROUGHTON et al., 2000; PERRET et al., 2000).

As espécies de rizóbios diferem quanto aos genes de nodulação que apresentam, e esta heterogeneidade é responsável pelas diversas estruturas dos fatores Nod liberados. Às decorações dos fatores Nod é atribuída à especificidade ou promiscuidade da interação com seu hospedeiro (BROUGHTON et al., 2000), assim como o regulador, gene *nodD*, cujo número e especificidade pelo seu hospedeiro é variável (HONMA et al., 1987; SPAINK et al., 1994, LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Os genes de nodulação se classificam em dois grupos, de acordo com sua função: comuns e específicos. Os genes comuns, tais como *nodABC*, estão presentes em todos os rizóbios estudados até hoje, e os específicos que constituem a maioria dos genes de nodulação descritos, são responsáveis pelas modificações no esqueleto oligossacarídico. Devido a que a presença de determinadas modificações nos factores Nod é imprescindível para a nodulação de certas leguminosas, estes genes são considerados como um dos principais determinantes da especificidade hospedeira (KONDOROSI et al., 1984).

Nem todas as leguminosas têm os mesmos requerimentos em relação as decorações presentes nos LCOs para que estes sejam reconhecidos pelos receptores da planta e realizem sua função. A falta de factores Nod comum com decorações específicas nas estirpes que nodulam o feijão, sugere que esta planta deve ter desenvolvido mecanismos de infecção e nodulação distintos das plantas que são noduladas por um número limitado de rizóbios (LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998).

## 8 GENOMA DE DIAZÓTROFOS SIMBIÓTICOS

Nesta década, grandes avanços no conhecimento de sistemas genéticos de vários organismos vivos, especialmente de bactérias, vêm sendo obtidos, sem sombra de dúvida, pela técnica de seqüenciamento de genomas. O seqüenciamento completo de genomas provê não somente a informação necessária para a realização de análises funcionais dos genes, como também conduz a novas percepções relacionadas às funções destes genes e evolução do genoma por comparação da composição dos genes e sua organização nos genomas entre as espécies (KANEKO et al., 2002).

No ano de 2000 foram depositados, no banco de genes do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), cinco genomas de bactérias: *Ureaplasma urealyticum*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydomphila pneumoniae* e *Corynebacterium stricutum* (NCBI, 2006). Já em 2006 estão depositados os genomas completos de mais de 382 microrganismos completos, incluindo 142 genomas de bactérias (com mais de uma estirpe para algumas espécies); contudo, a maioria dos genomas é referente a bactérias patogênicas ao homem ou extremofílicas (NCBI, 2006).

Os genomas de bactérias são comparativamente pequenos, variando de 580.074 pares de bases (pb), em *Mycoplasma genitalium*, a 9.105.828 pb em *B. japonicum* (NCBI, 2006). Além disso, as seqüências de diversos plasmídeos de rizóbios (*Rhizobium* sp. NGR 234 (agora classificado como *Sinorhizobium fredii*), *Rhizobium etli* e *Rhizobium rhizogenes*, este último renomeado como *Agrobacterium rhizogenes*) também estão disponíveis. O banco de genes do NCBI conta, ainda, com seqüências parciais de genomas e plasmídeos de bactérias e o seqüenciamento de outros 612 genomas estão em progresso (NCBI, 2006). Além disso, outra estratégia vem sendo utilizada, com o seqüenciamento parcial de genomas, permitindo obter valiosas informações. Esse foi o caso, por exemplo, da determinação de cerca de 10 a 15% do genoma de *Rhizobium* NGR 234 (VIPREY et al., 2000).

Até setembro de 2006, foram depositados mais de 50 genomas completos de AlphaProteobacteria e dentre estes, cinco são de rizóbios: *Mesorhizobium loti* estirpe MAFF303099 (KANEKO et al., 2000), *Sinorhizobium meliloti* estirpe 1021 (CAPELA et al., 2001; GALIBERT et al., 2001) e *Bradyrhizobium japonicum* estirpe USDA 110 (KANEKO et al., 2002), *Rhizobium etli* estirpe CFN42 (GONZÁLEZ et al., 2006) e *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* estirpe 3841 (YOUNG et al., 2006). Nos gêneros *Rhizobium* e

*Sinorhizobium*, o plasmídeo *Sym* contém a maioria dos genes responsáveis pela nodulação e fixação do nitrogênio. O seqüenciamento do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234 identificou a presença de 416 genes funcionais, incluindo 26 genes para nodulação e 26 genes para fixação do nitrogênio (FREIBERG et al., 1997).

A seqüência completa do genoma de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 demonstrou que seu genoma consiste de um único cromossomo, de 7 Mb e dois plasmídeos, pMLa, de 351,9 kb e pMLb, de 208,3 Kb. O cromossomo contém 6.752 genes codificadores de proteínas, além dos genes para RNAs ribossômicos e transportadores. Dos genes funcionais, 54% mostraram similaridade com genes de funções conhecidas. Um segmento de DNA de 611 Kb foi identificado como uma possível ilha simbiótica, contendo 30 genes para fixação de nitrogênio e 24 genes para nodulação. Os genomas dos plasmídeos pMLa e pMLb contêm, respectivamente, 320 e 209 genes potenciais para diferentes funções biológicas. Contudo, apenas um único gene plasmidial para nodulação foi identificado (KANEKO et al., 2000).

O genoma de *S. meliloti* estirpe 1021 também foi completamente seqüenciado, consistindo em um cromossomo de 3,7 Mb e dois plasmídeos, *pSymA* de 1,4 MB e *pSymB* de 1,7 Mb. Foram anotados 6.204 genes funcionais, sendo que 59,7% podem ter suas funções determinadas por comparações em bancos de dados. O cromossomo de *S. meliloti* é típico de bactérias aeróbicas heterotróficas. O plasmídeo *pSymB* estende os potenciais metabólicos, permitindo que a bactéria possa metabolizar uma variedade de pequenos compostos encontrados no solo ou na rizosfera da planta, além de permitir a síntese de polissacarídeos envolvidos na colonização do hospedeiro. O plasmídeo *pSymA* contém a maioria dos genes relacionados à nodulação e fixação do nitrogênio, conferindo a capacidade para a bactéria colonizar ambientes de baixa tensão de oxigênio e metabolizar uma variedade de formas químicas de nitrogênio (GALIBERT et al., 2001).

No gênero *Bradyrhizobium*, os genes envolvidos no evento de nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*), fixação do nitrogênio (genes *fix*) e síntese de nitrogenase (genes *nif*) estão localizados no cromossomo. A seqüência completa do genoma de *B. japonicum* estirpe USDA110 confirmou que seu genoma consiste em um único cromossomo de 9 Mb, sem a presença de plasmídeos. O cromossomo contém 8.317 genes codificadores de proteína, além dos genes para RNAs ribossômicos e transportadores. Dos genes funcionais, 52% puderam ter suas funções determinadas por comparações em bancos de dados, 34% dos genes de apresentam similaridade com *M. loti* e *S. meliloti* e 23% são únicos desta espécie. Um segmento de 681 kb foi identificado como uma possível ilha simbiótica, incluindo a região

cromossômica de 410 kb onde estão agrupados os genes de nodulação e fixação. Foram atribuídos 655 genes codificantes de proteína para essa região, sendo que 301 deles estão envolvidos na transmissão de DNA e fixação de N<sub>2</sub>. Foram anotados 167 genes para transposases, em 104 cópias de seqüências de inserção identificadas no genoma, além de 100 outros genes relacionados às transposases localizados na ilha simbiótica. Foi observado, em 14 posições diferentes do genoma, um segmento de DNA de 4 a 97 kb inserido nos genes de tRNA, com capacidade de gerar duplicação parcial nos genes alvos do tRNA. Estas observações sugerem uma plasticidade elevada no genoma de *B japonicum*, a qual, provavelmente, ocorre devido ao rearranjo complexo do genoma, incluindo transferência horizontal e inserção de vários elementos de DNA e recombinação homóloga (KANEKO et al., 2002).

A comparação entre os genomas de *S. meliloti* e *M. loti*, a região cromossomal de 410 Kb de *B. japonicum* e o plasmídeo simbiótico de 536 Kb de *Rhizobium* sp NGR 234, permite algumas conclusões como: 1) 35% dos genes de *M. loti* não apresentam equivalentes em *S. meliloti*; 2) as informações genéticas carregadas nos plasmídeos *pSymA* e *pSymB* em *S. meliloti* encontram-se dispersas no genoma de *M. loti*; 3) *M. loti* contém ilhas simbióticas, além dos genes de nodulação e fixação de nitrogênio, que não têm equivalente em *S. meliloti*; 4) *S. meliloti* não apresenta um sistema de secreção do tipo III, comum aos outros gêneros; e 5) 54% dos genes no plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. não apresentam equivalentes em *S. meliloti*. Todas estas observações indicam que rizóbios diferem significativamente quanto ao conteúdo e organização gênica, independentemente de suas relações taxonômicas e hábitos simbióticos (GALIBERT et al., 2001).

O genoma de *R. leguminosarum* biovar viceae estirpe 3841 também foi completamente seqüenciado, consistindo em um cromossomo de 5,05 Mb e seis plasmídeos com tamanhos de pRL12 (870 Kb), pRL11 (684 Kb), pRL10 (488 Kb), pRL9 (352 Kb), pRL8 (147 Kb) e pRL7 (151 Kb), perfazendo um total de 7,75 Mb. Foram anotados 7263 genes codificadores de proteínas, a maioria sendo encontrada no cromossomo. Apresenta 3 operons rRNA e 52 genes tRNA localizados no cromossomo e a maioria das classes funcionais ocorrem nos plasmídeos. 2056 genes tem ortólogos nos genomas de *Agrobacterium tumefaciens*, *S. meliloti* e *M. loti*. Dos genes funcionais, 69% demonstraram similaridade com genes de funções conhecidas (YOUNG et al., 2006).

A seqüência completa do genoma de *Rhizobium etli* CFN42 demonstrou que seu genoma consiste de um único cromossomo, de 4,38 Mb e seis plasmídeos, p42a (194 kb), p42b (184 Kb), p42c (250 Kb), plasmídeo simbiótico p42d (371 Kb), p42e (505 Kb) e p42f

(642 Kb) perfazendo um total de 6,53 Mb. Dos 6034 genes codificadores de proteínas, 4287 (71%) dos genes funcionais demonstraram similaridade com genes de funções conhecidas e 2892 deles estão localizados no cromossomo. Vários genes relacionados à simbiose estão localizados nos p42b (*lps*) e p42f (*fix*) e outros também no cromossomo. Os plasmídeos p42a e p42d são moléculas atípicas no contexto do restante do genoma, pois apresentam regiões altamente conservadas (*vir*, *tra* e *sym*) semelhantes as encontradas nos plasmídeos de *A. tumefaciens* (pTiC58), *Rhizobium* spp (pNGR234a) e *M. loti* (pMLa). Os outros quatro plasmídeos apresentam atributos coerentes entre eles e com o cromossomo, indicando assim um longo tempo de coevolução entre eles. As características estruturais do genoma de *R. etli* CFN 42 refletem importantes taxas evolucionárias de transferência horizontal de genes, duplicações, deleções e rearranjos genômicos (GONZÁLEZ et al., 2006).

O Brasil é, provavelmente, o país que mais tem utilizado os benefícios da FBN em culturas de grãos (HUNGRIA et al., 2003). Por isso, torna-se importante desenvolver estudos de genômica com estirpes brasileiras, mas o custo de um genoma completo é bastante elevado. Uma alternativa de estudo, no caso de grandes genomas, é utilizar uma estratégia denominada de panorama genômico que consiste no seqüenciamento parcial do genoma a partir da construção de bibliotecas pela técnica de “shotgun”, e que foi utilizada em *Rhizobium* NGR234, curada do plasmídeo simbiótico pNGR234a por Viprey et al., (2000). A leitura de 2.275 seqüências, nessa bactéria, resultou em mais de 575 kb correspondendo a, aproximadamente, 10% do genoma total. Ainda nesse trabalho, a busca de homologia em bancos de dados resultou na identificação de 1.130 seqüências codificando proteínas putativas e a análise dessas seqüências, em comparação com outros genomas, sugere que esse número foi suficiente para representar o genoma dessa bactéria. Além disso, diversas seqüências pioneiras foram identificadas, indicando que informações relevantes podem ser obtidas, a um custo acessível, pelo seqüenciamento parcial do genoma (VIPREY et al., 2000).

Estima-se que o genoma de *R. tropici* esteja entre 7 e 8 milhões de pares de bases. Desse modo, considerando-se a metodologia proposta por Viprey et al. (2000), a análise de, aproximadamente, 10% a 15% do genoma, seria necessária, para obter um panorama genômico da estirpe PRF 81, cerca de 3.000 leituras de boa qualidade, com 300 pb o que equivale a, aproximadamente, 5.000 leituras no MegaBace1000. Acredita-se que, com essa cobertura, seja possível identificar cerca de um terço de genes de importância na dinâmica do genoma de *R. tropici* PRF 81, buscando aqueles com potencial de exploração biotecnológica, com ênfase em genes que aumentem o potencial de FBN, tais como: genes de nodulação, *nod*, *noe*, *nol* e fixação, *fix* e *nif*, ou proteínas regulatórias de transcrição

relacionadas à competitividade, bem como com a capacidade saprofítica da estirpe. Pretende-se, pela análise desses genes, identificar diferenças na distribuição dos genes dessa estirpe eficiente e competitiva e que permitam delinear novas estratégias que contribuam para minimizar as limitações à FBN, freqüentemente relatadas na simbiose com a cultura do feijoeiro.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, M. O.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 13548-13553, 2004.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p. 1298-1307, 2006.

AMARAL, E.S.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Symbiotic performance and survival of plasmid-cured derivatives of the rhizobial strain Br 855 in soil under heat stress. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS æ THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.I.,: Embrapa-CNPBS, 1995. p.104-105.

AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, v.161, p. 147-156, 1994.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov.; from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 996-1006, 1997.

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E.; The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4025-4034, 2002.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYMON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 4016-4021, 1995.

ARAJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAJO, R.S.; HUNGRIA, M., (eds.), **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994, p. 91-120.

BAL, A. K.; SHANTHARAM, S.; WONG, P. P. Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.965-971, 1982.

BATISTA, J.S.S., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., FERREIRA, M.C., MENDES, I.C., 2006. 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** (DOI 10.1007/s00248-006-9149-2).

BECKING, J. The *Rhizobium* symbiosis of the nonlegume *Parasponia*. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p. 497-559.

BEEBE, S.; RENGIFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science**; v. 41; p. 854-862; 2001.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 155-194, 2005.

BROM, S.; GIRALD, L.; GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; SANJUÁN-PINILLA, J. M.; OLIVARES, J.; SANJUÁN, J. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2555 - 2561, 2002.

BROM, S.; MARTÉNEZ, E.; D'ÉVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p. 1280-1283, 1988.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*; *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous fertilizer and to inoculation with *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 369-372, 1990.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M. S.; BEEBE, P.; GEPTS, P., VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S.; PERRET, X.. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5641-5652, 2000.

CAPELA, D.; BARLOY-HUBLER, F.; GOUZY, J. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.9877-82, 2001.

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.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p. 393-397, 1998.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F.O. Classificação taxonômica; baseada na caracterização molecular; das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro. Londrina: Embrapa Soja; 2000. 36 p. (Boletim Técnico; 3).

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Avaliação da safra de grãos 2005/2006: Terceiro levantamento Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/boletim.pdf>>. Acesso em fevereiro de 2006.

COSTA, J.G. C.; VIEIRA, N. R. A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F.; (eds.), **Cultura do feijoeiro no Brasil: Características da Produção**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e feijão, 2000, p. 51-64.

DAGUTAT, H.; STEYN, P. L. Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils. In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E.; (eds.) **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995, p. 683.

DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant culture involving symbiotic legumes. **New Phytologist**, v. 158, p. 39-49, 2003.

de BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and entero-bacterial 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.

de LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERN, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov.; sp. nov.; nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.58, p.1277-1290, 1998.

de LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 715- 733, 1994.

D'HAENZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factors structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v.12, p. 79-105, 2002.

DIOUF, A.; LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MARTÈNEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v. 50, p. 3987-3997, 2000.

DOWNIE, J.A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: SPAINK, H.P., KONDOROSI, A., HOOYKAAS, P.J.J. (eds.), **The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.387-402.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1998.

EARDLY, B. D.; HANNAWAY, B.; BOTTOMLEY, P. J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules, ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1422-1427, 1985.

EARDLY, B. D.; MATERON, L.A.; SMITH, N. H.; JOHNSON, D. A.; RUMBAUGH, M. D., SELANDER, R. K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.187-194, 1990.

EARDLY, B. D.; NOUR, S. M.; VAN BERKUM, P.; SELANDER R. K. Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* Genes: Mosaicism and the Uncertain Phylogenetic Placement of *Rhizobium galegae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1328-1335, 2005.

EARDLY, B.D.; YOUNG, J. P. W.; SELANDER, R. K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1809-1815, 1992.

ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v. 1, p. 584-588, 1978.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão). **Sistemas de produção do feijoeiro**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: 12 dezembro de 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **FAOSTAT-Agricultural Production Statistical Databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 25 julho de 2006.

FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; BROM, S. ; MARTÈNEZ, E. ; PIÑERO, D. ; ROMERO, D.; DÉVILA, G.; PALACIOS, R. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 5782-5788, 1987.

FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; PARDO, M. A.; LEIJA, A.; MARTÈNEZ, E.; ROMERO, D.; PINERO, D.; DÉVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 1191-1196, 1988.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932, p. 343.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 332-394, 1997.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M., et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v.293, p.668-672, 2001.

GALLI-TERASAWA, L.; GLIENKE-BLANCO, G.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 933-939, 2003.

GARRITY, G. M., HOLT, J. G. The road map to the Manual: In GARRITY, G. M., (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, New York: Springer-Verlag, 2001, p. 119-155.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. W. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2037-2048, 2001.

GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÈNEZ, E. Presence of megaplasms in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.392-394, 1995.

GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabacea) beans. **Economic Botany**, v. 44, p. 28-38, 1990.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. **Economic Botany**, v. 42, p. 86-104, 1988.

GIL-SERRANO, A.; SÈNCHEZ DEL JUNCO, A.; TEJERO-MATEO, P.; MEGIAS, M.; CAVIEDES, M.A. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. phaseoli CIAT 899. **Carbohydrate Research**, v.204, p.103-107, 1990.

GONZÈLEZ, V.; SANTAMARIA, R. I., et al. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 3834-3839, 2006.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTÈNEZ, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198-207, 1994.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p.1389-1398, 2004.

HARDARSON, G.; BLISS, F. A.; CIGALES-RIVERO, M. R.; HENSON, R. A.; KIPENOLT, P.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÈNEZ-ROMERO, E.; PUEPPLE, S. G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2775-2779, 1995.

HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÈNEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S. G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 7, p. 2775-2779, 1995.

HERRERA, M. A.; BEDMAR, E. J.; OLIVARES, J. Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. **Plant Science**, v.42, p.177-182, 1985.

HEYNDRICKX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 247-259, 1996.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HONMA, B.; BACHEM, C.W.B.; AUSUBEL, F.M. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p.8558-8562, 1987.

HUGHES, D. Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. **Genome Biology**, v. 1, p. 1- 8, 2000.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUITIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÈAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. O.; GRANGE, L.; MEGÈAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 387-394, 2001.

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

HUNGRIA, M.; FRANCO, A; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., (Ed.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p 189-294.

JARVIS, B. D. W.; PANKHURST, C. E.; PATEL, J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Bacteriology**, v. 32, p. 378-380, 1982.

JORDAN, D. C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G., (eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins Co., 1984, p. 235-244.

KAMI, J.; BECERRA-VELASQUEZ, V; DEBOUCK, D. G.; GEPTS, P., Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 1101-1104, 1995.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y., et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7, p. 331-338, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y., et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v.9, p. 189-197, p. 225-256, 2002.

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

KHAMIS, A.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afipia* and *Bosea* Species, Including a Strategy for Choosing Discriminative Partial Sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6740-6749, 2003.

KIM, W.; HONG, Y.; YOO, J.; LEE, W.; CHOI, C.; CHUNG, S. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 207, p. 21-27, 2001.

KONDOROSI, E.; BANFALVI, Z.; KONDOROSI, A. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. **Molecular and General Genetics**, v. 193, p. 445-452, 1984.

KRIEG, N.R. Identification of prokaryotes. In: GARRITY, G., ed., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.1, New York: Springer-Verlag, 2001, p.33-38.

LAEREMANS T.; VANDERLEYDEN, J. Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 787-808, 1998.

LAFAY, B.; BURDON, J. J., Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 396-402, 2001.

LAGUERRE, G. ; MAVINGUI, P. ; ALLARD, M.-R. ; CHARNAY, M. P. ; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I. ; 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, p. 2029-2036, 1996.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 566-573, 1994.

LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M. P.; EDEL, V.; NORMAND, P; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus Vulgaris* L. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p. 761-767, 1993.

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.

LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÈNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A., PROVOROV, N.A., ROMANOV, V.I., NEWTON, W.E., (eds.), **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 807- 810.

LIU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28; p. 465-477, 2005.

LLORET, L.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, p. 43-60, 2005.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, S.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v.19, p. 554-568, 1998.

MANYANI, H. **Análisis de los genes de nodulación implicados en la sulfatación de la molécula señal de *Rhizobium tropici* CIAT899**. 2000. 185f. Tese (Mestrado em Microbiologia). - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade de Sevilha, Sevilha, 2000.

MARTÈNEZ, E.; FLORES, S.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÉVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. **Plant and Soil**, v.108, p.179-184, 1988.

MARTÈNEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v.131, p.1779-1786, 1985.

MARTÈNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives, **Plant and Soil**, v. 11, p. 11-23, 2003.

MARTÈNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, p. 113-140, 1996.

MARTÈNEZ-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. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÈNEZ-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.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO J NIOR, W. Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 49- 58, 1998.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, v. 26, p. 1005-101, 1997.

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.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em:  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_g.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.html)>. Acesso em: 16 agosto de 2006.

NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J. C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Sytematic Bacteriology**, v. 44, p. 511-522, 1994.

PALAWSKA, J.; MAES, M.; WILLEMS, A.; SOBICZEWSKI, P. Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. **Systematic Applied of Microbiology**, v. 23, p. 238-244, 2000.

PERRET, X., C. STAEHELIN, AND W. J. BROUGHTON. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology Molecular Biol. Review** 64: 180-201.

PICHON, M., E. P.; JOURNET, A.; DEDIEU, F.; de BILLY, G.; TRUCHET, T.; BARKER., D. G. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. **The Plant Cell**,v. 4, p. 1199- 1211, 1992.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; de BRUJIN, 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 BRUJIN, F. J. (eds.), **Molecular Microbial Ecology Manual**, Dordrecht: Klumer Academy Publishers, v.343, 1998, p. 1-26.

ROMERO, D.; SINGLETON, P. W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B. B.; PALACIOS, R.; DÊVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p.848-850, 1988.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J.O., MOREIRA, F. M .S., LOPES, A. S., GUILHERME, L. R. G., FAQUIN, V., FURTINNI NETO, A.E.; CARVALHO, J. G., (eds.), **Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships**. Lavras:UFLA/DCS, p.429-448, 1999.

SADOWSKI, M. J., CREGAN, P. B.; KEYSER, H .H. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1907-1910, 1988.

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.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 647-660, 2000.

SCHULTZE, M., KONDOROSI, E. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 33-57, 1998.

SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.426-433, 1991.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP of PCR amplified rRNA and by fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 517-528, 1996.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTINÉZ- ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* Research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.323-378, 2002.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4033-4050, 2005.

SOBERÌN-CHAVES, G.; NAJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 487-491, 1986.

SPAINK, H.P.; LUGTENBERG, B.J.J. Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1413-1422, 1994.

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. **Systematic Applied of Microbiology**, v. 26, p. 483-94, 2003.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. .A.; RUMJANEK, N. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 3-11, 1999.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M .G. **A Variabilidade Genética do Feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Seropédica: Embrapa CNPAB, 2000. 59p. (Embrapa- Documentos, 126).

SUZUKI, K.; IWATA, K.; YOSHIDA, K. Genome analysis of *Agrobacterium tumefaciens*: construction of physical maps for linear and circular chromosomal DNAs, determination of copy number ratio and mapping of chromosomal virulence genes. **DNA Research**, v. 8, p. 141-152, 2001.

TEREFWORK, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.349-356, 1998.

TESFAYE, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, B .H. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v 43, p. 526- 533. 1997.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 19-28, 1991.

THOMAS, P. M., GOLLY, K. F., ZYSKIND, J. W., VIRGINIA, R. A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 1146-1153, 1994.

TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, p. 309-319, 2000.

van BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 240-244, 1996.

van BERKUM, P.; TEREFWORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTRÖM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2988-2998, 2003.

van RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 124-142, 1995.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, p. 390-397, 2001.

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: Embrapa-CPAC, 1997, p. 524.

VÊSQUEZ, M.; DÊVALOS, A.; DE LAS PEÑAS, A.; SÊNCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1250-1258, 1991.

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.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; de BRUIJIN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2096-2104, 1998.

VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. **Systematic Applied and Microbiology**, v. 28, p. 702-716, 2005a.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, p. 29-54, 2005b.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. K.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v.1, p.1-17, 2000.

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root and stem nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E.W., ed., **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Madison: Horizon Scientific Press, 2000, p. 177-186.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based upon 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 305-313, 1993.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; WEIR, B. S. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. Implications for species determinations. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 125-131, 2004.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.2271-2277, 1991.

YOUNG, J. P.; CROSSMAN, L. C., et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biology**, v.7, R34.1- 20, 2006.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

**Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains  
effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Fabiana Gisele da Silva Pinto, Mariangela Hungria, Fábio Martins Mercante

Number of text pages        25

Number of tables        02

Number of figures        07

Corresponding author

Mariangela Hungria

Embrapa Soja

Cx. Postal 231

86001-970, Londrina, Paraná, Brazil

Fax: +55-43-33716100

Telephone: +55-43-33716206

E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

32 **Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains**  
33 **effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**

34

35 Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1,2,3,4</sup>, Mariangela Hungria<sup>1,3,4,1</sup>, Fábio Martins Mercante<sup>5</sup>

36

37 <sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Dept. of Microbiology; Cx. Postal 60001, 86051-990, Londrina, PR, Brazil38 <sup>2</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, 85819-110, Cascavel, PR, Brazil39 <sup>3</sup>Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina40 <sup>4</sup>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-MCT)41 <sup>5</sup>Embrapa Agropecuária Oeste, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, MS, Brazil

42

---

43 **Abstract**

44 Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is native to the Americas, and *Rhizobium etli* is the  
45 dominant microsymbiont in both the Mesoamerican and the Andean centers of genetic  
46 diversification. Wild common beans are not found in Brazil, although the legume has been  
47 cropped there throughout time and all but one of the rhizobial species that nodulate it  
48 (*Rhizobium gallicum*) have been broadly detected in Brazilian soils. However, the majority  
49 of the effective rhizobial strains isolated so far from field-grown plants belong to *R. tropici*.  
50 This study describes the analysis of symbiotic and non-symbiotic genes of fifteen effective  
51 *R. tropici* strains, isolated from four geographically distant regions in Brazil. With RFLP-  
52 PCR of the 16S and 23S rRNA genes and sequence analysis of 16S rRNA, two clusters  
53 were observed, one related to *R. tropici* type A and another to type B strains. Diversity in  
54 ribosomal genes was high, indicating that type A strains might represent a new species.  
55 High intraspecies diversity was also observed in the *rep*-PCR analysis with BOX, ERIC  
56 and REP primers. However, in the RFLP-PCR analysis of *nifH* and *nodC* genes, all *R.*  
57 *tropici* showed unique combinations of profiles, which might reflect an evolutionary  
58 strategy to maximize N<sub>2</sub> fixation.

59

60 *Keywords:* Bacterial genetic diversity; Biological nitrogen fixation; Common bean;  
61 *Rhizobium etli*; *Rhizobium tropici*

---

62

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Tel.: +55 43 33716206; fax: + 55 43 33717100, E-mail address:  
hungria@cnpso.embrapa.br.

## 63 1. Introduction

64

65 Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) represents the most important source of protein  
66 for the poorer populations of Central and South America, with Brazil being the largest  
67 grower and consumer of the legume worldwide (Embrapa, 2006). *Phaseolus vulgaris* is  
68 considered native to the Americas, and domestication thought to have taken place  
69 separately in two major centers of genetic diversification: the Mesoamerican center or  
70 northern group (from Mexico to the northern region of South America), and the Andean  
71 center or southern group (from southern Peru to the north of Argentina); a third minor  
72 domestication center might exist in Colombia (Gepts and Bliss, 1988; Gepts 1990; Kami et  
73 al., 1995). Archeological evidences indicate that common bean was spread by migration  
74 and trade among Indian populations throughout history.

75 An important feature of the common bean plant is its ability to establish a symbiotic  
76 partnership with specific bacteria, setting up the biological N<sub>2</sub>-fixation process in root  
77 nodules that may supply the plant's needs for N. Five species of *Rhizobium* have been  
78 described as capable of nodulating—and in most cases fixing N<sub>2</sub>—with common bean: *R.*  
79 *leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R.*  
80 *etli* bv. *phaseoli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* (bv. *gallicum* and bv. *phaseoli*) and *R.*  
81 *giardinii* (bv. *giardinii* and bv. *phaseoli*) (Amarger et al., 1997). Furthermore, other  
82 genetically diverse isolates have been isolated from common bean nodules, possibly  
83 representing new species (Eardly et al., 1995; van Berkum et al., 1996; Stralioetto et al.,  
84 1999; Grange and Hungria, 2004), while others can nodulate common bean but usually do  
85 not fix N<sub>2</sub> under laboratory conditions, and have not yet been isolated from field-grown  
86 plants (e.g., Michiels et al., 1998; Lok et al., 2006; Wang and Martínez-Romero, 2006).

87 Studies have indicated that *R. eti* is the dominant microsymbiont in both the  
88 Mesoamerican and the Andean centers of genetic diversification (Segovia et al., 1993;  
89 Souza et al., 1994; Aguilar et al., 1998, 2004; Bernal and Graham, 2001; Martínez-Romero,  
90 2003). After colonization by Europeans, common bean was introduced into Europe and  
91 seeds may have carried *R. etli* which transferred its symbiotic plasmid to indigenous *R.*  
92 *leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Later, *R. leguminosarum* may have transferred the  
93 plasmid to *R. gallicum* bv. *phaseoli* and *R. giardinii* bv. *phaseoli* (Amarger et al., 1997). *R.*  
94 *tropici* was originally isolated from common bean nodules in Colombia and was then found

95 to be abundant in Brazilian soils, trapped by either common bean or *Leucaena* sp.  
96 (Martínez-Romero et al., 1991; Mercante, 1993; Mercante et al., 1998). However, *R.*  
97 *tropici* has also been isolated from nodules of common bean and other legumes in Europe  
98 (e.g., Amarger et al., 1994), Africa (e.g., Anyango et al., 1995; Odee et al., 2002), Australia  
99 (e.g., Lafay and Burdon, 1998, 2001), and Central America (e.g., Acosta-Durán and  
100 Martínez-Romero, 2002).

101 All described common bean rhizobial species have been detected in Brazilian soils,  
102 except for *R. gallicum*, (Sá et al., 1993; Mercante et al., 1998; Stralioetto et al., 1999;  
103 Oliveira et al., 2000; Mostasso et al., 2002; Grange and Hungria, 2004). In population  
104 studies, high percentages of *R. etli* (Grange and Hungria, 2004; Grange et al., 2006) and of  
105 *R. leguminosarum* (Stralioetto et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002) were  
106 recovered when dilutions of Brazilian soils were used as inocula for common bean plants  
107 under axenic conditions. However, *R. tropici* was clearly dominant in field-grown plants,  
108 even when cultivars of the Mesoamerican group were used as trap hosts (Hungria et al.,  
109 1997, 2000, 2003; Oliveira et al., 2000; Mostasso et al., 2002). The dominance of *R. tropici*  
110 in nodules of field-grown plants has been attributed to the intrinsic properties of the  
111 species, particularly tolerance of acidic and high-temperature conditions (Martínez-Romero  
112 et al., 1991; Graham et al., 1994; Hungria et al., 2000, 2003), resulting in stronger  
113 competitiveness under the often-stressful tropical conditions in Brazil (Mercante, 1993;  
114 Hungria and Stacey, 1997; Hungria et al., 1997, 2000, 2003; Mercante et al., 1998; Hungria  
115 and Vargas, 2000; Mostasso et al., 2002).

116 In light of these results, together with the important feature of higher symbiotic stability  
117 of *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), probably due to the presence of a unique copy  
118 of the *nifH* gene (Martínez-Romero et al., 1991; Geniaux et al., 1993), a strain-selection  
119 program was established in Brazil in 1994 aimed at selecting strains belonging to this  
120 species that are effective in fixing N<sub>2</sub>. The first criterion considered in this program was the  
121 ability to nodulate both common bean and *Leucaena* sp. and to grow *in vitro* at elevated  
122 temperatures (Martínez-Romero et al., 1991), although these properties may not be  
123 exclusive to *R. tropici* (e.g., Hernandez-Lucas et al., 1995). Three strains (CIAT 899, PRF  
124 81 and H 12) have been identified in this selection program, capable of supplying sufficient  
125 N to support grain yields of 2,500 kg ha<sup>-1</sup> or more (Hungria et al., 2000, 2003); they have  
126 been officially recommended for the use in Brazilian commercial inoculants for common

127 bean crops (MAPA, 2006). However, despite economic importance and the promising  
128 results achieved, Brazilian strains of high N<sub>2</sub>-fixation capacity are still poorly  
129 characterized. Accordingly, the aim of this study was to characterize very effective putative  
130 *R. tropici* strains isolated from different Brazilian regions using a polyphasic approach that  
131 includes phenotypic properties and genetic analysis of ribosomal and symbiotic genes.

132

## 133 2. Material and methods

134

### 135 2.1. Rhizobial strains

136

137 *Rhizobium tropici* type A strain CFN 299 (=USDA 9039; =USDA 9029; =LMG 9517;  
138 =UMR1026; =CENA 183), and type B strain CIAT 899<sup>T</sup> (=USDA 9030; USDA 2744;  
139 =UMR1899; =TAL 1797; =HAMBI 1163; =CM01; =SEMIA 4077; =ATCC 49672;  
140 BR322), and *R. etli* bv. *phaseoli strain* CFN 42<sup>T</sup> (=USDA 9032) were supplied by Dr.  
141 Esperanza Martínez, Centro de Ciencias Genómicas, Cuernavaca, Mexico. *R.*  
142 *leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671 (=RCR 3644), *R. leguminosarum* bv. *viciae*  
143 USDA 2370<sup>T</sup> (=ATCC 10004), and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ATCC 14480 (=USDA  
144 2145, =LMG 8820) were provided by Dr. Peter van Berkum (USDA, Beltsville, MD,  
145 USA). *R. giardinii* bv. *giardinii* strain H152<sup>T</sup> and *R. gallicum* bv. *gallicum* strain R602<sup>T</sup>  
146 were provided by Dr. Noelle Amarger, INRA, Dijon, France.

147 Eleven (Table 1) strains used in this study, isolated by our group, were chosen as the  
148 most effective in fixing N<sub>2</sub> in previous work. They were isolated from the southern state of  
149 Paraná (PR) (Hungria et al., 2000), in the Federal District (FD), from the central state of  
150 Goiás (GO) (Mostasso et al., 2002), and from PR and the northeastern state of Pernambuco  
151 (PE) (Grange and Hungria, 2004) (Fig. 1); some of their properties were described in those  
152 studies. Strains PRF 81 (Hungria et al., 2000) and H 12 (Mostasso et al., 2002; Hungria et  
153 al., 2003) have also received the denominations of SEMIA 4080 and SEMIA 4088,  
154 respectively.

155 Four other Brazilian strains (CPAO 2.11, CPAO 12.5, CPAO 29.8 and CPAO 1135)  
156 were isolated from the state of Mato Grosso do Sul (MS), in the central-western region  
157 (Fig. 1) and are described for the first time in this study. They were identified as the most

158 effective strains in fixing N<sub>2</sub> among 527 isolates collected from 87 sites in 34 districts  
159 covering all common bean producing areas of the state.

160 Strains were maintained in yeast-mannitol (YM) liquid broth (YMB, Vincent, 1970)  
161 mixed with glycerol (25%) and stored at -80°C, and working cultures were maintained on  
162 YM agar slants at 4°C. Rhizobia were cultured routinely at 28°C in YMB on a rotary  
163 shaker operating at 65 cycles min<sup>-1</sup>. All strains have been deposited in the “Diazotrophic  
164 and PGPR Bacteria Culture Collection” of Embrapa Soja.

165

## 166 *2.2. Morpho-physiological characterization*

167

168 Colony morphology (size, color, mucosity, transparency, borders and elevation) and  
169 acid/alkaline reaction *in vitro* were evaluated as described by Vincent (1970), after 3 and 5  
170 days of growth in the dark, at 28°C, on YM solid medium (YMA, containing 12 g of agar  
171 L<sup>-1</sup>), with bromothymol blue (0.00125%) as a pH-change indicator. Growth in Luria broth  
172 (LB) and in peptone-yeast extract (PY) minus Ca medium (Martínez-Romero et al., 1991),  
173 as well as in tryptone-yeast-extract medium (TY, Somasegaran and Hoben, 1994) at 40°C  
174 and in TY modified for a pH of 4.0 was verified as described before (Hungria et al., 2000).

175

## 176 *2.3. Genetic characterization*

177

### 178 *2.3.1. Extraction of total DNA*

179

180 Total DNA of the strains was extracted as described by Kaschuk et al. (2006). To  
181 obtain clean DNA, the extraction procedure included the addition, for each 400 µL of  
182 bacteria resuspended in TE 50/20, of 50 µL of 10% SDS, 5 µL of proteinase-K (20 mg mL<sup>-1</sup>)  
183 <sup>1</sup>), 10 µL of lysozyme (5 mg mL<sup>-1</sup>), and 2 µL of RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>). After two steps of  
184 purification with ethanol at 99.5% and at 70%, the pellet was resuspended in 50 µL of TE  
185 10/1 to estimate the concentration of the DNA. Samples were then diluted to 20 ng of DNA  
186 µL<sup>-1</sup> and kept at -20°C.

187

### 188 *2.3.2. rep-PCR fingerprinting with BOX, ERIC and REP primers*

189

190 PCR amplification of repetitive regions of the DNA (*rep*-PCR) was carried out with  
191 BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994),  
192 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) (ERIC1R, 3'-  
193 CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'; and ERIC2, 5'-  
194 AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3'), and repetitive extragenic palindromic (REP)  
195 (REP1R, 3'-CGGICTACIGCIGCIII-5'; and REP2-I, 5'-CGICTTATCI GGCCTAC-3')  
196 (de Bruijn, 1992) primers. DNA fingerprintings with the BOX primer were obtained  
197 following the procedure described by Kaschuk et al. (2006), while the amplification with  
198 ERIC and REP primers was performed as described by Santos et al. (1999). The reactions  
199 were performed in an MJ Research Inc. PT 200 thermocycler. The amplified fragments  
200 were separated by electrophoresis on 1.5% agarose (low EEO, type I-A) gels (20 × 25 cm),  
201 at 120 V, for 7 h. The 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>) was used as a molecular size  
202 marker on the right, left and central lanes of each gel. The gels were stained with ethidium  
203 bromide and photographed under UV radiation with a Kodak Digital Science 120  
204 apparatus. The profiles obtained were confirmed in triplicate.

205

206 *2.3.3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR-amplified DNA region*  
207 *coding for the 16S rRNA gene*

208

209 The DNA of each strain was amplified with the universal primers rD1 (3'-  
210 AAGGAGGTGATCCAGCC-5') and fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), which  
211 correspond to positions 8–27 and 1524–1540, respectively, of *Escherichia coli* strain K12  
212 (Weisburg et al., 1991). Volumes and cycles used in the reaction were as described before  
213 (Germano et al., 2006). Six- $\mu$ L aliquots of the PCR products were then digested separately  
214 with each of the following restriction enzymes: *Hpa*II (=MspI) (5' – C/CGG – 3'), *Hha*I  
215 (=CfoI) (5' - GCG/C – 3'), *Dde*I (5' – C/TNAG – 3') and *Hae*III (5' – GG/CC – 3')  
216 (Invitrogen<sup>TM</sup>), as recommended by the manufacturers. The fragments obtained were  
217 analyzed by electrophoresis in a 3% agarose gel (17 × 11 cm) at 120 V for 4 h. The 1-kb  
218 Plus DNA Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>) was used as a molecular marker in the right, left and  
219 central lanes of each gel. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under  
220 UV radiation with a Kodak Digital Science 120 apparatus. The profiles obtained were  
221 confirmed twice.

222

223 *2.3.4. RFLP-PCR of the DNA region coding for the 23S rRNA gene*

224

225 The DNA of each strain was amplified with primers P3 (5'-  
226 CCGTGCGGGAAAGGTCAAAAGTAC -3') and P4 (5'-CCCGCTTAGTGCTTTCAGC -  
227 3') (Terefework et al., 1998), and the volumes and the cycles were performed as described  
228 by Germano et al. (2006). Six- $\mu$ L aliquots of the PCR products were digested with three  
229 restriction enzymes, *Hha*I, *Hae*III and *Hinf*I (5'-GANT/C-3') (Invitrogen<sup>TM</sup>), as  
230 recommended by the manufacturers. The fragments obtained were visualized and  
231 photographed as described in item 2.3.3, and the profiles obtained were confirmed twice.

232

233 *2.3.5. RFLP-PCR of the DNA region coding for the nifH and nodC genes*

234

235 For the *nifH* region, the DNA of each strain was amplified with primers *nifHF*  
236 (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') and *nifHI*  
237 (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3') (Laguerre et al., 2001), as described before  
238 (Grange et al., 2006), resulting in a product of approximately 780 bp. Amplification of the  
239 *nodC* region was achieved using *nodCF* (5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3') and  
240 *nodCI* (5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3') primers (Laguerre et al., 2001), also as  
241 described by Grange et al. (2006), and resulting in a fragment of about 930 bp. After  
242 amplification, 6- $\mu$ L aliquots of the PCR products were digested separately with the  
243 following restriction enzymes (Invitrogen<sup>TM</sup>): *Hpa*II, *Hae*III and *Mbo*II (=NdeI) for the  
244 *nifH* DNA region and *Hpa*II, *Hae*III, *Mbo*II, *Rsa*I and *Hinf*I for the *nodC* DNA region, as  
245 recommended by the manufacturers. The fragments obtained were visualized and  
246 photographed as described in item 2.3.3, and the profiles obtained were confirmed twice.

247

248 *2.3.6. Sequencing analysis of the DNA region coding for the 16S rRNA gene*

249

250 To obtain the full-length portion of the 16S rDNA (approximately 1,500 bp), five  
251 reactions were carried out with the primers described by Menna et al. (2006) [fD1  
252 (Weisburg et al., 1991, item 2.3.3); Y2 (5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3',  
253 Young et al., 1991); 362f (target region 339-362) (5'-

254 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'); 786f (target region 764-786) (5'-  
255 CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGG-3'); and 1203f (target 1179-1203) (5'-  
256 GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3')]. Reactions and sequencing analyses were  
257 carried out using the same procedures as described before (Menna et al., 2006). Sequencing  
258 was performed in a MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences),  
259 with the dye terminator chemistry.

260

### 261 2.3.7. Plasmid profiles

262

263 The plasmid profiles were obtained as described previously by Eckhardt (1978), with  
264 modifications. Cells were grown in 2 mL of PY liquid medium at 28°C to an optical density  
265 of 0.3 at 600 nm and 200 µL were pelleted by centrifugation (12,000 rev min<sup>-1</sup>, 4°C, 1  
266 min). After that, 900 µL of N-lauroylsarcosine 0.3% were added and centrifuged again.  
267 The cells were lysed by adding 20 µL of saccarose solution 10% (with RNase 0.4 mg/mL;  
268 lysozyme 2 µg/mL). The plasmids were separated by electrophoresis on 0.8% agarose (low  
269 EEO, type I-A) gels (12 × 25 cm), at 10 V, for 12 h. *R. etli* strain CFN 42 was used as a  
270 molecular size reference.

271

### 272 2.4. Data analyses

273

#### 274 2.4.1. DNA profiles obtained in the rep-PCR and RFLP-PCR analyses

275

276 The sizes of the fragments in each analysis were normalized according to the MW of  
277 the DNA markers. The fingerprintings obtained in the RFLP-PCR and in the *rep*-PCR  
278 analyses were analyzed using BioNumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk,  
279 Belgium, version 1.50), setting up a position tolerance of 2%. In the RFLP-PCR analysis,  
280 the analysis was performed first with the profiles obtained with each restriction enzyme and  
281 then with the combined profiles obtained with all restriction enzymes. The analyses were  
282 performed using the unweighted pair-grouping method with arithmetic mean (UPGMA)  
283 algorithm (Sneath and Sokal, 1973) with the coefficient of Jaccard (Jaccard, 1912).

284

#### 285 2.4.2. Analyses of the complete sequences of the 16S rRNA genes

286

287 The high-quality sequences obtained for each strain were assembled into contigs using  
288 the phred, phrap and consed programs as described before (Menna et al., 2006). Sequences  
289 confirmed in the 3' and 5' directions were submitted to the GenBank database  
290 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to seek significant alignments.

291 Of the Brazilian rhizobia, *R. tropici* strains PRF 81 (AF260274), PRF 35 (AF260298)  
292 (Chueire et al., 2003), and PRF 77 (AY117667) have been sequenced (Grange and  
293 Hungria, 2004). Strains H 12, H 20, H 52, H 53 have been partially sequenced before, but  
294 have not been deposited in the GenBank database. Therefore, the full sequences for the  
295 strains were obtained, submitted to the GenBank database and received the accession  
296 numbers (EF054889, EF054890, EF054891 and EF054892), respectively. A partial  
297 sequence of strain 233 (AY117622) was known (Grange and Hungria, 2004); in this study,  
298 sequencing of the entire gene was achieved and the database was updated. Sequences  
299 coding for the entire 16S rRNA genes of the strains 130, 131 and 141 were obtained and  
300 when submitted to the GenBank database received the accession numbers EF054884,  
301 EF054885 and EF054886, respectively. Finally, accession numbers EF054887, EF054883,  
302 EF054888 and EF054882 were given to strains CPAO 2.11, CPAO 12.5, CPAO 29.8 and  
303 CPAO 1135, respectively.

304 Multiple alignments were performed with ClustalX version 1.83 (Thompson et al.,  
305 1997). Phylogenetic trees were generated using MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004)  
306 with default parameters, K2P distance model (Kimura, 1980) and the Neighbor-Joining  
307 algorithm (Saitou and Nei, 1987), using *Azospirillum brasilense* strain A154 (DQ104848)  
308 as an outgroup reference for the 16S rRNA phylogeny. Statistic supports for tree nodes  
309 were evaluated by bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 2,000 samplings (Hedges,  
310 1992).

311 The sequences obtained were aligned and compared to those of the following  
312 type/reference strains (accession numbers of the GenBank Data Library in parentheses): *R.*  
313 *etli* CFN 42<sup>T</sup> (U28916); *R. tropici* (type A) CFN 299 (X98514); *R. tropici* (type B) CIAT  
314 899<sup>T</sup> (U89832); *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA 2671 (U29388); *R. leguminosarum*  
315 bv. viciae USDA 2370<sup>T</sup> (U29386); *R. leguminosarum* bv. trifolii ATCC 14480  
316 (AY509900); *R. giardinii* bv. giardinii strain H152<sup>T</sup> (U86344); *R. gallicum* bv. gallicum  
317 strain R602<sup>T</sup> (U86343); and *Rhizobium rhizogenes* strain ATCC 11325 (AY945955).

318

319 **3. Results**

320

321 *3.1. Morpho-physiological characterization*

322

323 All Brazilian and reference/type common bean rhizobial strains used in this study  
324 formed circular colonies with regular borders, flat in elevation, opaque in color, showing  
325 intermediate to high production of mucus. After 3 to 5 days of growth on YMA at 28°C, all  
326 strains acidified the medium (as indicated by the bromothymol blue) and colony diameter  
327 ranged from 2 to 5 mm (data not shown).

328 Three out of the four strains from the state of Mato Grosso do Sul (MS) (CPAO 2.11,  
329 CPAO 12.5 and CPAO 29.8, as well as strains 77 (from Pernambuco, PE), 130, 141 and  
330 PRF 35 (from Paraná, PR) were unable to growth in LB or PY minus Ca media (Table 1),  
331 typical characteristics of all common bean rhizobial species except for the great majority of  
332 *R. tropici* type B strains (Martínez-Romero et al., 1991). Three other strains from PR (PRF  
333 81, 131, 233) and all strains from the Federal District (FD) grew poorly on both media,  
334 giving colony sizes of only approximately 10% of those observed for CIAT 899<sup>T</sup>. In  
335 relation to the growth at 40°C and in medium of pH 4.0, the great majority of the Brazilian  
336 strains grew as well as *R. tropici* type B strain CIAT 899<sup>T</sup>. The exceptions were poorer  
337 growth of strains 77 and 141, similar to *R. tropici* type A strain CFN 299, and the absence  
338 of growth of strain 130, as observed for all other common bean rhizobial species (Table 1).

339

340 *3.2. Analysis of combined BOX, ERIC and REP- PCR genomic fingerprints*

341

342 A high level of genetic diversity was observed in the *rep*-PCR fingerprintings (Fig. 2).  
343 When the combined profiles obtained with the three sets of primers (BOX, ERIC and REP)  
344 were submitted to cluster analysis using the UPGMA algorithm and the coefficient of  
345 Jaccard, five groups emerged, joined at a final level of similarity of 46%, with each strain  
346 identified by a unique combination of profiles. Group I clustered with a similarity of 52%,  
347 containing *R. tropici* type B strain CIAT 899<sup>T</sup> with seven Brazilian strains from the central  
348 (DF), central-western (MS) and southern regions (PR). The second cluster joined the three  
349 reference strains of *R. leguminosarum* with strain 130 (PR), with a similarity of 67%. Type

350 strains CFN 42<sup>T</sup> and R602<sup>T</sup> had a low similarity of 48% in the third group. The fourth  
351 cluster included strain CFN 299 of *R. tropici* with the three CPAO strains from MS and  
352 with strains 77 (from PE) and 141 (from PR), with a similarity of 57%. Finally, strains 131  
353 and 233, both from PR, were linked to *R. giardinii* H152<sup>T</sup> in cluster V, also with a  
354 similarity of 57% (Fig. 2).

355

### 356 3.3. RFLP-PCR of the 16S rDNA and 23rDNA regions

357

358 The DNA amplification with the primers for the 16S rDNA region resulted in a single  
359 product of about 1,500 bp for seventeen strains, while the PCR product obtained with five  
360 Brazilian strains (77, 141, CPAO 2.11, CPAO 12.5 and CPAO 29.8), as well as with *R.*  
361 *tropici* type A CFN 299 had about 1,600 bp (data not shown). Five combinations of profiles  
362 were obtained when the products were digested with four restriction enzymes (Table 2, Fig.  
363 3) The five Brazilian strains mentioned above also shared similar profiles as strain CFN  
364 299, while nine others were similar to *R. tropici* type B CIAT 899<sup>T</sup>. The only Brazilian  
365 rhizobium that did not share similar profiles with *R. tropici* was strain 130, with profiles  
366 similar to *R. leguminosarum*. Enzyme *HhaI* allowed the identification of all *R. tropici*, and  
367 the combination of only three restriction enzymes (*DdeI*, *HaeIII* and *HhaI* or *HpaII*)  
368 allowed the identification of four out of the five rhizobial species. However, four restriction  
369 enzymes did not allow differentiation between *R. etli* and *R. gallicum* (Table 2).

370 A unique fragment of ~2.3 kb was obtained for all common bean rhizobial strains when  
371 the DNAs were amplified with the primers for the 23S rDNA region (data not shown).  
372 After the digestion of the PCR fragments with three restriction enzymes, seven  
373 combinations of profiles were obtained (Table 2, Fig. 3). All five rhizobial species were  
374 identified by unique combinations of profiles. Similar to what has been observed for the  
375 RFLP-PCR of the 16S rDNA, *R. tropici* type A resulted in a different combination of  
376 profiles than type B CIAT 899<sup>T</sup>. However, for the 23S rRNA region, restriction enzyme  
377 *HaeIII* resulted in different profiles for type B strains, one including strain CIAT 899<sup>T</sup> and  
378 three Brazilian strains (H 12, H 20 and 131) and another with six other Brazilian strains  
379 (CPAO 1135, 233, H 52, H 53, PRF 35 and PRF 81) (Table 2). The cluster analysis of the  
380 RFLP-PCR products of the 16S rDNA and 23S rDNA regions indicates high variability of  
381 the ribosomal genes within the species *R. tropici* (Fig. 4).

382

383 *3.4. Phylogeny based on the 16S rRNA gene*

384

385 Almost full sequences of the 16S rRNA genes were obtained for all strains and 1,450  
386 bp were considered in the multiple alignment analysis to build a phylogenetic tree. All  
387 strains that shared similar RFLP-PCR profiles with *R. tropici* were joined in one cluster,  
388 strongly supported by the bootstrap analysis (99%), that also included *R. rhizogenes* strain  
389 ATCC 11325 (Fig. 5). However, within this cluster, *R. tropici* type A strains were  
390 positioned in a different subcluster with a bootstrap support of 100%. The subcluster with  
391 the other *R. tropici* strains was more diverse and four Brazilian strains (PRF 35, H 52, H 53  
392 and PRF 81) were split into another group. Sequencing analysis confirmed the similarity of  
393 nucleotides of strain 130 with *R. leguminosarum*, and none of the Brazilian strains was  
394 clustered with *R. gallicum* or *R. etli* (Fig. 5). Finally, the sequencing analysis strongly  
395 supported the results obtained in the RFLP-PCR analysis (Table 2).

396

397 *3.5. RFLP-PCR of the DNA region coding for the nifH and nodC genes*

398

399 The amplification reaction with *nifH* primers produced a fragment of about 780 bp for  
400 all strains except for *R. giardinii* bv. *giardinii* H152<sup>T</sup> (data not shown), as expected, since  
401 this biovar probably lacks *nifKDH* genes (Geniaux et al., 1993; Amarger et al., 1997).  
402 When the PCR products were digested with three restriction enzymes, a combination of six  
403 profiles was obtained, one for each species or biovar included in the study (Table 2, Fig. 6);  
404 furthermore, the *nifH* pattern of each species was recognized by the use of only one  
405 restriction enzyme (Table 2).

406 The DNA amplification with primers for the *nodC* gene resulted in a single product of  
407 about 930 bp for all strains including *R. giardinii*. When the PCR products were digested  
408 with five restriction enzymes, six different combinations of profiles were obtained (Fig. 6).  
409 Once more all *R. tropici* strains shared similar profiles, and contrarily to the results  
410 obtained with *nifH*, *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* showed similar profiles of  
411 RFLP-PCR of the *nodC* gene (Table 2).

412

413 *3.6. Plasmid profiling*

414

415 Eleven plasmid profiles were detected (Fig. 7), consisting of three to four plasmids for  
416 each strain, except for *R. etli* strain CFN 42<sup>T</sup>, characterized by six plasmids. Six plasmid  
417 profiles could be discerned among the fifteen bean strains (Table 2; Fig. 7). The most  
418 abundant profile (P2) was shared by *R. tropici* type B CIAT 899<sup>T</sup>, together with the four  
419 Brazilian strains (77, CPAO 2.11, CPAO 12.5, CPAO 29.8) that have shown similar  
420 ribosomal genes as CFN 299 and with four (H 12, H 20, 131, 233) of the nine strains that  
421 shared similarity with CIAT 899<sup>T</sup> (Table 2). Similar plasmid profiles were observed for  
422 strain 130 and *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA 2671 (Table 2).

423

#### 424 4. Discussion

425

426 Common bean is native to the Americas (Gepts and Bliss, 1988; Gepts 1990; Kami et  
427 al., 1995), and despite being one of the most promiscuous hosts in its symbiotic  
428 associations with rhizobia (Michiels et al., 1998; Herrera-Cervera et al., 1999; Martínez-  
429 Romero, 2003), there is evidence that *R. etli* bv. phaseoli is the dominant microsymbiont in  
430 both the Mesoamerican and the Andean centers of genetic diversification (Kipe-Nolt et al.,  
431 1992; Segovia et al., 1993; Souza et al., 1994; Aguilar et al., 1998, 2004; Bernal and  
432 Graham, 2001; Martínez-Romero, 2003). However, there is archeological evidence that for  
433 centuries seeds were exchanged among American Indian populations, resulting from trade  
434 and migration (e.g., Prous, 1986; Freitas, 2001, 2006), likely carrying viable cells of *R. etli*  
435 (Pérez-Ramírez et al., 1998; Andrade and Hungria, 2002). Later, with colonization by  
436 Europeans, seeds of common bean—probably carrying *R. etli*—were introduced into  
437 Europe, and the symbiotic plasmid transferred to local *R. leguminosarum* bv. phaseoli  
438 (Segovia et al., 1993), and then to *R. gallicum* bv. phaseoli (Amarger et al., 1997).

439

440 The origin of the symbiotic association of common bean with *R. tropici* is not as clear  
441 as that with *R. etli*. One hypothesis is that *R. tropici* is indigenous to South America  
442 (Martínez-Romero et al., 1991), and Brazil is a strong candidate, representing the source of  
443 the great majority of the strains isolated so far (Hungria et al., 1993, 1997, 2000; Mercante,  
444 1993; Mercante et al., 1998; Stralioetto et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al.,  
445 2002; Grange and Hungria, 2004; this study). However, in view of the fact that wild  
common beans are not found in Brazil (Debouck, 1986), *R. tropici* could be a

446 microsymbiont of other indigenous host legumes, and possible candidates are species of  
447 the genera *Mimosa* and *Gliricidia*, reported to establish very effective symbioses with *R.*  
448 *tropici* under field conditions (Menna et al., 2006). It is noteworthy that *R. tropici* has also  
449 been reported as a microsymbiont of indigenous legumes in Mexico, *Gliricidia* (Acosta-  
450 Durán and Martínez-Romero, 2002) and in Africa, *Bolusanthus* and *Spartium* (Dagut and  
451 Stein, 1995). Finally, it should also be considered that the presence of *R. tropici* as the  
452 microsymbiont of common bean plants in other countries (e.g., Amarger et al., 1994;  
453 Anyango et al., 1995) could also be explained by trade or migration, e.g., common bean  
454 seeds may have carried from Brazil to Africa in the sixteenth century.

455 In our study, fifteen common bean rhizobia very effective in fixing N<sub>2</sub>, isolated in four  
456 surveys performed in different regions of Brazil (Hungria et al., 2000; Mostasso et al.,  
457 2002; Grange and Hungria, 2004; this study) were genetically characterized in relation to  
458 conserved and symbiotic genes. Based on the RFLP-PCR analysis of the 16S and 23S  
459 rRNA genes, and on the sequencing of the 16S, all strains but one (130) were classified as  
460 *R. tropici*. A first conclusion is that the results confirm that the species is capable of  
461 establishing effective symbioses with common bean in a variety of Brazilian ecosystems,  
462 from the humid subtropics in the southern region, through the savannah-type climate of the  
463 central and central-western regions, to the semi-arid climate of the northeast. Two factors  
464 may have contributed to the broad association of *R. tropici* with common bean in Brazil.  
465 First, the broadly infective nature of *R. tropici*, and its high capacity to establish effective  
466 symbioses even with exotic newly introduced crops, e.g., leucaena (Mercante, 1993;  
467 Mercante et al., 1998) and soybean (Hungria et al., 2006). Second, the intrinsic properties  
468 of *R. tropici* of high competitiveness and genetic stability under the acidic-soil (Hungria  
469 and Stacey, 1997; Hungria and Vargas, 2000) and high-temperature (Hungria and Franco,  
470 1993; Hungria et al., 1993; Mercante, 1993; Sá et al., 1993; Amaral, 1998; Pinto et al.,  
471 1998; Amaral and Baldani, 1999; Hungria and Vargas, 2000; Raposeiras et al., 2002)  
472 conditions that predominate in Brazil.

473 One major feature of the Brazilian *R. tropici* strains in our study was their high  
474 variability in ribosomal genes. Based on the 16S rRNA sequence, on the rRNA operon, and  
475 on the DNA-DNA hybridization (values lower than 36%), it has been suggested that *R.*  
476 *tropici* species could be separated in two subgroups, namely types A and B (Martínez-  
477 Romero et al, 1991; Laguerre et al. 1994; Geniaux et al., 1995). Among several intrinsic

478 characteristics of type A group, Willems and Collins (1993) and van Berkum et al.  
479 (1994) reported an insertion of seventy-two nucleotides in the 16S rRNA genes, although  
480 later Laguerre et al. (1994) found that not all strains shared this characteristic. In our study,  
481 five strains, from the states of Pernambuco, Paraná and Mato Grosso do Sul were clustered  
482 together in the RFLP-PCR analysis (Fig. 4) and showed complete identity of bases of the  
483 16S rRNA gene (Fig. 5) with type A strain CFN 299—apparently also a Brazilian strain  
484 (Martínez et al., 1987; Navarro et al., 1993; van Berkum et al., 1996)—and also had the  
485 inserted nucleotides. Furthermore, the cluster of the 16S rRNA sequences of type A strains  
486 was dissimilar to that including type B strain CIAT 899<sup>T</sup>.

487 The variability in the ribosomal genes observed in the type B strains was very high. In  
488 both the RFLP-PCR of the 16S and of the 23S rRNA and in the sequencing analysis of the  
489 16S rRNA gene, strain CIAT 899<sup>T</sup> was positioned in a first subcluster, together with two  
490 strains from the state of Paraná, one from Mato Grosso do Sul and two from the Federal  
491 District. Those strains shared similar profiles in RFLP-PCR of both 16S and 23S rRNA  
492 genes and differed by 0.5 to 0.63% of nucleotides in comparison to CIAT 899<sup>T</sup>.  
493 Additionally, a second subcluster was observed, which included two strains from the state  
494 of Paraná and two from the Federal District, very dissimilar from subcluster I, with strains  
495 differing in up to 0.89% of nucleotides in comparison to CIAT 899<sup>T</sup>. Therefore, one major  
496 conclusion is that our work reinforces the concept that type A strains represent a new  
497 species. However, the intrinsic properties of type A and type B strains should be re-  
498 evaluated, as at least the Brazilian strains showed mixed morphological and physiological  
499 characteristics of both types (Hungria et al., 2000; this study). Additionally, our work also  
500 showed that all but one of the Brazilian strains share similarity of ribosomal genes with  
501 type A strain CFN 299 and had plasmid profiles similar to that of type B CIAT 899<sup>T</sup> (Table  
502 2).

503 High intraspecies diversity among the Brazilian *R. tropici* strains was also revealed by  
504 the analysis with the consensus sequences BOX, ERIC and REP (Fig. 2), capable of  
505 amplifying repetitive and conservative elements diffused in DNA. *rep*-PCR profiles may be  
506 very useful for strain identification, although often not for phylogenetic characterization  
507 (Laguerre et al., 1996; Mostasso et al., 2002; Grange and Hungria, 2004; Kaschuk et al.,  
508 2006), and in our study each strain was characterized by a unique combination of *rep*-PCR  
509 profiles.

510 In contrast to the variability observed in conserved genomic regions, all Brazilian *R.*  
511 *tropici* strains shared similar RFLP-PCR *nifH* and *nodC* profiles (Fig. 6), indicating that the  
512 genes might be closely related. *nifH* genes may be strongly conserved, and less variability  
513 than with the ribosomal genes has been observed before, e.g., for *Bradyrhizobium*  
514 *japonicum* (Batista et al., 2006); the similarity could be related, for example, to the  
515 conserved structure of the nitrogenase iron protein. In relation to the similarity in *nodC*  
516 genes, it is possible that rhizobia showing closely related *nod* genes produce similar Nod  
517 factors more effective for specific common bean receptors, enabling nodulation. Finally,  
518 similarity of *nifH* and *nodC* genes might indicate horizontal gene transfer of ancestral  
519 common bean rhizobia to indigenous *R. tropici*, a subject that deserves further  
520 investigation.

521 Although both *R. etli* and *R. leguminosarum* are broadly present in Brazilian soils  
522 (Straliotto et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002; Grange and Hungria,  
523 2004; Grange et al., 2006), when very effective rhizobia were isolated from common bean  
524 field-grown plants, *R. tropici* represented the majority of the strains (e.g., Hungria et al.,  
525 2000, 2003; Mostasso et al., 2002; this study). Strong competitiveness, tolerance of  
526 stressful environmental conditions and genetic stability of symbiotic genes in *R. tropici*  
527 make it a good choice for use in inoculants for application to common bean in Brazil. Two  
528 *R. tropici* strains (PRF 81 and H 12) have already been recommended for use in  
529 commercial inoculants, supporting high grain yields (Hungria et al., 2000, 2003). That  
530 strategy might be considered in other countries showing similar soil and environmental  
531 conditions, e.g., in Africa. The relevance of our study lies in the addition of genetic  
532 information on Brazilian *R. tropici* very effective in fixing N<sub>2</sub>. Our results highlight an  
533 intriguing characteristic of the strains: high variability in ribosomal genes supports the  
534 theory that the current *R. tropici* comprises two species, and high similarity in *nifH* and  
535 *nodC* genes may reflect an evolutionary advantage maximizing N<sub>2</sub> fixation.

536

### 537 **Acknowledgements**

538

539 Research described herein was partially supported by MCT (Ministério da Ciência e  
540 Tecnologia)-CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

541 Tecnológico)/PRONEX/Instituto do Milênio/Edital Universal/Edital em Biotecnologia).

542 The authors thank Dr. Allan R. J. Eaglesham for suggestions on the manuscript.

543

#### 544 **References**

545

546 Acosta-Durán, C., Martínez-Romero, E., 2002. Diversity of rhizobia from nodules of the  
547 leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Archives of  
548 Microbiology 178, 161–164.

549 Aguilar, O.M., Lopez, M.V., Riccillo, P.M., Gonzalez, R.A., Pagano, M., Grasso, D.H.,  
550 Pühler, A., Favelukes, G., 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes  
551 coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated  
552 with wild beans from the Southern Andes in Argentina. Applied and Environmental  
553 Microbiology 64, 3520–3524.

554 Aguilar, O.M., Riva, O., Peltzer, E., 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis  
555 with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification.  
556 Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 101, 13548–13553.

557 Amaral, E.S., 1998. Papel de plasmídeos em estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro  
558 (*Phaseolus vulgaris* L.): estabilidade, efetividade simbiótica e tolerância a estresses  
559 ambientais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 122 p. (M.Sc.  
560 thesis).

561 Amaral, E.S., Baldani, J.I., 1999. Environmental stresses affecting the survival and stability  
562 of plasmids of common bean rhizobia strains in soil. Anais da Academia Brasileira de  
563 Ciências 71, 545–552.

564 Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M.R., Laguerre, G., 1994. *Rhizobium tropici*  
565 nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. Plant and Soil 161, 147–156.

566 Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G., 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and  
567 *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of  
568 Systematic Bacteriology 47, 996–1006.

569 Andrade, D.S., Hungria, M., 2002. Maximizing the contribution of biological nitrogen  
570 fixation in tropical legume crops. In: Finan, T.M., O'Brian, M.R., Layzell, D.B.,  
571 Vessey, J.K., Newton W.E. (Eds), Nitrogen Fixation Global Perspectives. CABIO  
572 Publishing, London, pp. 341–345.

- 573 Andrade, D.S., Murphy, P.J., Giller, K.E., 2002. The diversity of *Phaseolus*-nodulating  
574 rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris*  
575 L. in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4025–4034.
- 576 Anyango, B., Wilson, K.J., Beynon, J.L., Giller, K.E., 1995. Diversity of *Rhizobium*  
577 nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Applied*  
578 *and Environmental Microbiology* 61, 4016–4021.
- 579 Batista, J.S.S., Hungria, M., Barcellos, F.G., Ferreira, M.C., Mendes, I.C., 2006. Variability  
580 in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the  
581 exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecology* (DOI  
582 10.1007/s00248-006-9149-2).
- 583 Bernal, G., Graham, P.H., 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus*  
584 *vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal*  
585 *of Microbiology* 47, 526–534.
- 586 Chueire, L.M.O., Bangel, E., Mostasso, F.L., Campo, R.J., Pedrosa, F.O., Hungria, M.,  
587 2003. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas  
588 da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. *Revista Brasileira*  
589 *de Ciência do Solo* 27, 833–840.
- 590 Dagut, H., Steyn, P.L., 1995. Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South  
591 African soils. In: Tikhnovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I., Newton, W.E.  
592 (Eds.), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer, Boston, pp. 683–  
593 686.
- 594 de Bruijn, F.J., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and  
595 enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain  
596 reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil  
597 bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 58, 2180–2187.
- 598 Debouck, D.G., 1986. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: Three centers?  
599 *Plant Genetic Resources Newsletter* 67, 2–8.
- 600 Eardly, B.D., Young, J.P.W.; Wang, F.S., Whittan, T.S., Selander, R.K., 1995. Species  
601 limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*).  
602 *Applied and Environmental Microbiology* 61, 507–512.
- 603 Eckhardt, T., 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid  
604 in bacteria. *Plasmid* 1, 584–588.

- 605 Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2006. Agência de informação  
606 – Feijão. Retrieved in 14<sup>th</sup> of September, 2006. from <  
607 <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/Abertura.html>>
- 608 Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.  
609 *Evolution* 39, 783–791.
- 610 Freitas, F.O., 2001. Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de  
611 milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Escola Superior de Agricultura  
612 “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 125 p. (Ph.D. thesis).
- 613 Freitas, F.O., 2006. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no  
614 Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1199–1203.
- 615 Geniaux, E., Laguerre, G., Amarger, N., 1993. Comparison of geographically distant  
616 population of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular*  
617 *Ecology* 2, 295–302.
- 618 Geniaux, E., Flores, M., Palacios, R., Martínez, E., 1995. Presence of megaplasmids in  
619 *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici*  
620 subtypes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 392–394.
- 621 Gepts, P., 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus*  
622 (Fabacea) beans. *Economic Botany* 44, 28–38.
- 623 Gepts, P., Bliss, F.A., 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*,  
624 Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa.  
625 *Economic Botany* 42, 86–104.
- 626 Germano, M.G., Menna, P., Mostasso, F.L., Hungria, M., 2006. RFLP analysis of the RNA  
627 operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume  
628 species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 217–  
629 229.
- 630 Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E.,  
631 Aarons, S.R., Quinto, C., 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and  
632 *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici*  
633 UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 198–207
- 634 Grange, L, Hungria, M., 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus*  
635 *vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1389–  
636 1398.

- 637 Grange, L., Hungria, M., Graham, P.H., Martínez-Romero, E., 2006. New insights into  
638 the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*)  
639 in Brazil. *Soil Biology & Biochemistry* (accepted).
- 640 Hedges, S.B., 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the  
641 bootstrap *P* value in phylogenetic studies. *Molecular Biology and Evolution* 9, 366–  
642 369.
- 643 Hernandez-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E., Pueppke, S.G., 1995. Phylogenetic  
644 relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L.  
645 *Applied and Environment Microbiology* 61, 2775–2779.
- 646 Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N.,  
647 Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuan, J., 1999. At least five  
648 rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology*  
649 *Ecology* 30, 87–97.
- 650 Hungria, M., Franco, A.A., 1993. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen  
651 fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 149, 95–102.
- 652 Hungria, M., Stacey, G., 1997. Molecular signals exchanged between host plants and  
653 rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology &*  
654 *Biochemistry* 29, 819–830.
- 655 Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factor affecting N<sup>2</sup> fixation in grain  
656 legumes in the tropics, with an emphasis in Brazil. *Field Crops Research* 65, 151–164.
- 657 Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Probanza, A., Guitierrez-Manero, F.J.,  
658 Megías, M., 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean  
659 (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 21, 1515–  
660 1528.
- 661 Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C., 2003. Benefits of inoculation of common bean  
662 (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains.  
663 *Biology and Fertility of Soils* 39, 88–93.
- 664 Hungria, M., Chueire, L.M.O., Megías, M., Lamrabet, Y., Probanza, A., Guttierrez-  
665 Mañero, F.J., 2006. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia  
666 isolated from soybean nodules. *Plant and Soil* (DOI 10.1007/s1104-006-9125-0).
- 667 Hungria, M., Franco, A.A., Sprent, J.I., 1993. New sources of high-temperature tolerant  
668 rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 186, 331–341.

- 669 Hungria, M., Vargas, M.A.T., Araujo, R.S., 1997. Fixação biológica do nitrogênio em  
670 feijoeiro. In: Vargas, M.A.T., Hungria, M. (Eds.), *Biologia dos Solos dos Cerrados*.  
671 EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brazil, pp.189–295.
- 672 Jaccard, P., 1912. The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11, 37–50.
- 673 Jordan, D.C., 1984. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's*  
674 *Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 235–244.
- 675 Kami, J., Becerra-Velasquez, Debouck, D.G., Gepts, P., 1995. Identification of presumed  
676 ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proceedings of the*  
677 *National Academy of Sciences, USA*, 92, 1101–1104.
- 678 Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D.S., Campo, R.J., 2006. Genetic diversity of rhizobia  
679 associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and  
680 conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology* 32, 210–220.
- 681 Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions  
682 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*  
683 16, 111–120 .
- 684 Kipe-Nolt, J.A., Montealegre M., Tohme, J., 1992. Restriction of nodulation by the broad  
685 host range *Rhizobium tropici* strain CIAT899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris*  
686 L. *New Phytologist* 120, 489–494.
- 687 Kumar, S., Tamura, K, Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular  
688 evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5,  
689 150–163.
- 690 Lafay, B., Burdon, J.J., 1998. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby  
691 legumes in southeastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3989–  
692 3997.
- 693 Lafay, B., Burdon, J.J., 2001. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating  
694 Australian *Acacia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 396–402.
- 695 Laguerre, G., Allard, M.-R., Revoy, F., Amarger, N., 1994. Rapid identification of rhizobia  
696 by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA  
697 genes. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 56–63.
- 698 Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.-R., Charnay, M.-P., Louvrier, P., Mazurier, S.-I.,  
699 Rigottier-Gois, L., Amarger, N., 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting  
700 and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and

- 701 symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different  
702 buovars. Applied and Environmental Microbiology 62, 2029–2036.
- 703 Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N., 2001.  
704 Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close  
705 phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology 147,  
706 981–993.
- 707 Lok, E.H., O’Hara, G., Dell, B., 2006. Nodulation of the legume *Pterocarpus indicus* by  
708 diverse strains of rhizobia. Journal of Tropical Forest Science 18, 188–194.
- 709 MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2006. Instrução Normativa  
710 Nº 10, de 21 de março de 2006. Retrieved on 14<sup>th</sup> April, 2006, from <  
711 [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&i  
712 d=16735](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&i<br/>712 d=16735)>
- 713 Martínez, E., Palacios, R., Sánchez, F., 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by  
714 *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. Journal of  
715 Bacteriology 169, 2828–2834.
- 716 Martínez-Romero, E., 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis:  
717 overview and perspectives. Plant and Soil 252, 11–23.
- 718 Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M.A.,  
719 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and  
720 *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic Bacteriology 41, 417–426.
- 721 Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F.G., Bangel, E.V., Hess, P.N., Martínez-Romero, E.,  
722 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used  
723 in Brazilian commercial inoculants. Systematic and Applied Microbiology 29, 315–  
724 332.
- 725 Mercante, F.M., 1993. Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante  
726 a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro. Universidade Federal Rural do Rio  
727 de Janeiro, Seropédica, 149 p. (M.Sc. thesis).
- 728 Mercante, F.M., Cunha, C.O., Straliootto, R., Ribeiro-Junior, W.Q., Vanderleyden, J.,  
729 Franco, A.A., 1998. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strain  
730 from the Brazilian cerrado region. Revista de Microbiologia 29, 49–58.

- 731 Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., Vanderleyden, J., 1998.  
732 *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiology Ecology  
733 26, 193–205.
- 734 Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hingria, M., 2002. Selection of  
735 bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops  
736 Research 73, 261–272.
- 737 Navarro, R.B.A., Vargas, A.T., Schöder, E.C., van Berkum, P., 1993. Uptake hydrogenase  
738 (Hup) in common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. Applied and Environmental  
739 Microbiology 59, 4161–4165.
- 740 Odee, D.W., Haukka, K., McInroy, S.G., Sprent, J.I., Sutherland, J.M., Young, J.P.W.,  
741 2002. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and  
742 herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil  
743 Biology & Biochemistry 34, 801-811.
- 744 Oliveira, I.A., Vasconcellos, M.J., Seldin, L., Paiva, E., Vargas, M.A.T., Sá, N.M.H., 2000.  
745 Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated  
746 with beans cultivated in Brazilian Cerrado soils. Brazilian Journal of Microbiology 31,  
747 39–44.
- 748 Pérez-Ramírez, N.O., Rogel, M.A., Wang, E., Castellanos, J.Z., Martínez-Romero, E.,  
749 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiology  
750 Ecology 26, 289–296.
- 751 Pinto, P.P., Raposeiras, R., Macedo, A.M., Seldin, L., Paiva, E., Sá, N.M.H., 1998. Effects  
752 of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of  
753 bean nodulating *Rhizobium* strains. Revista de Microbiologia 29, 295–300.
- 754 Prous, A., 1986. L'archéologie au Brésil: 300 siècles d'occupation humaine.  
755 L'Antropologie 90, 257–306.
- 756 Raposeiras, R., Pinto, P.R., Passos, R.V.M., Seldin, L., Paiva, E., Scotti, M.R., Sá, N.M.H.,  
757 2002. Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and  
758 after exposure to high temperature. Brazilian Journal of Microbiology 33, 149–154.
- 759 Sá, N.M.H., Scotti, M.R.M.L., Paiva, E., Franco, A.A., Döbereiner, J., 1993. Selection and  
760 characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable of fixing nitrogen in bean  
761 (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Microbiologia 24, 38–48.

- 762 Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for  
763 reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- 764 Santos, M.A., Vargas, M.A.T., Hungria, M., 1999. Characterization of soybean  
765 bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. *FEMS Microbiology*  
766 *Ecology* 30, 261–272.
- 767 Segovia, L., Young, J.P.W., Martínez-Romero, E., 1993. Reclassification of American  
768 *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.  
769 *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 374–377.
- 770 Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co, San  
771 Francisco, 573 pp.
- 772 Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. *Handbook for Rhizobia – Methods in Legume*  
773 *Rhizobium* Technology. Springer-Verlag, New York, 450 pp.
- 774 Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappelo, R., Gallardo, C., Montoya, J., Piñero, D., 1994.  
775 Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated  
776 bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Applied*  
777 *and Environmental Microbiology* 60, 1260–1268.
- 778 Straliotto, R., Cunha, C.O., Mercante, F.M., Franco, A.A., Rumjanek, N.G., 1999.  
779 Diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from  
780 Brazilian tropical soils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 71, 531–543.
- 781 Terefework, Z., Nick, G., Suomalaine, S., Paulin, L., Lindström, K., 1998. Phylogeny of  
782 *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *International*  
783 *Journal of Systematic Bacteriology* 48, 349–356.
- 784 Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The  
785 CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment  
786 aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- 787 van Berkum, P., Beyene, D., Eardly, B.D., 1996. Phylogenetic relationships among  
788 *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International*  
789 *Journal of Systematic Bacteriology* 46, 240–244.
- 790 van Berkum, P., Navarro, R.B., Vargas, A.A., 1994. Classification of the uptake  
791 hydrogenase-positive (Hup<sup>+</sup>) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Applied and*  
792 *Environmental Microbiology* 60, 554–561.

- 793 Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting  
794 of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in*  
795 *Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.
- 796 Vincent, J.M., 1970. *Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell  
797 Scientific, Oxford, pp.164. (IBP Handbook, 15).
- 798 Wang, E.T., Martínez-Romero, J.C., 2006. Taxonomia de *Rhizobium*. In: Martínez Romero,  
799 E., Martínez Romero, J.C. (Eds.), *Microbes en Linea*. Retrieved on 6<sup>th</sup> February, 2006,  
800 from <[http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_12/Capitulo12.](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf#search=%22Rhizobium%20tropici%20Mexico%22)  
801 [pdf#search=%22Rhizobium%20tropici%20Mexico%22](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf#search=%22Rhizobium%20tropici%20Mexico%22)>.
- 802 Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA  
803 amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.
- 804 Willems, A., Collins, D., 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on  
805 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 305–  
806 313.
- 807 Young, J.P.W., Downer, H.L., Eardly, B.D., 1991. Phylogeny of the phototrophic  
808 *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S  
809 rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology* 73, 2271–2277.

Table 1

Growth *in vitro* of common bean rhizobial strains in LB, PY without Ca, and in TY media at 40°C or with pH 4.0.

Strain	Species	Geographic origin	LB	PY	40°C	pH 4.0
CFN 299	<i>Rhizobium tropici</i> type A	Brazil	N <sup>a</sup>	N	P	P
CIAT 899 <sup>T</sup>	<i>R. tropici</i> type B	Colombia	Y	Y	Y	Y
USDA 2370 <sup>T</sup>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	USA	N	N	N	N
USDA 2671	<i>R. leg.</i> bv. <i>phaseoli</i>	England	N	N	N	N
ATCC 14480	<i>R. leg.</i> bv. <i>trifolii</i>	unknown	N	N	N	N
CFN 42 <sup>T</sup>	<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i>	Mexico	N	N	N	N
R602 <sup>T</sup>	<i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i>	France	N	N	N	N
H152 <sup>T</sup>	<i>R. giardinii</i> bv. <i>giardinii</i>	France	N	N	N	N
----- Brazilian strains -----						
CPAO 2.11		Campo Grande, MS	N	N	Y	Y
CPAO 12.5		Taquarussu, MS	N	N	Y	Y
CPAO 29.8		Dois Irmãos do Buriti, MS	N	N	Y	Y
CPAO 1135		Dourados, MS	P	P	Y	Y
H 12		Planaltina, DF	P	P	Y	Y
H 20		Planaltina, DF	P	P	Y	Y
H 52		Planaltina, DF	P	P	Y	Y
H 53		Planaltina, DF	P	P	Y	Y
77		Santo Antônio, PE	N	N	P	P
130		São João, PR	N	N	N	N
131		São João, PR	P	P	Y	Y
141		São João, PR	N	N	P	P
233		Francisco Alves, PR	P	P	Y	Y
PRF 35		Londrina, PR	N	N	Y	Y
PRF 81		Londrina, PR	P	P	Y	Y

<sup>a</sup>All characteristics were confirmed in three replicates. Y, yes, normal growth; N, no growth; P, poor growth, of about 10% of that observed in the strains classified as

Table 2

Profiles of plasmids and of RFLP-PCR<sup>a</sup> of the ribosomal 16S rDNA and 23S rDNA regions and of the symbiotic *nifH* and *nodC* rDNA regions. The analyses were performed with Brazilian selected strains very effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean and reference/type strains of the described species microsymbionts of this legume

Strain	Species	Plasmid profile	16S rDNA				23S rDNA			<i>nifH</i>			<i>nodC</i>			
			<i>DdeI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HpaII</i>	<i>MboI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>
CFN 299	<i>R. tropici</i> type A	P1	A <sup>a</sup>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
77	<i>R. tropici</i>	P2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
141	<i>R. tropici</i>	P3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CPAO 2.11	<i>R. tropici</i>	P2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CPAO 12.5	<i>R. tropici</i>	P2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CPAO 29.8	<i>R. tropici</i>	P2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CIAT 899 <sup>T</sup>	<i>R. tropici</i> type B	P2	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
CPAO 1135	<i>R. tropici</i>	P6	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
H 12	<i>R. tropici</i>	P2	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
H 20	<i>R. tropici</i>	P2	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
131	<i>R. tropici</i>	P2	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
233	<i>R. tropici</i>	P2	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
H 52	<i>R. tropici</i>	P5	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
H 53	<i>R. tropici</i>	P5	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
PRF 35	<i>R. tropici</i>	P3	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
PRF 81	<i>R. tropici</i>	P4	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A
130	<i>R. leg. bv. phaseoli</i>	P7	B	C	C	B	C	A	B	B	B	B	D	D	D	D
USDA 2671	<i>R. leg. bv. phaseoli</i>	P7	B	C	C	B	C	A	B	B	B	B	D	D	D	D
USDA 2370 <sup>T</sup>	<i>R. leg. bv. viciae</i>	P8	B	C	C	B	C	A	B	D	D	D	B	B	B	B
ATCC 14480	<i>R. leg. bv. trifolii</i>	P10	B	C	C	B	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C
CFN 42 <sup>T</sup>	<i>R. etli</i> bv. phaseoli	P11	B	C	C	C	D	C	B	B	B	B	D	D	D	D
R602 <sup>T</sup>	<i>R. gallicum</i> bv. gallicum	P9	B	C	C	C	A	A	B	E	E	E	E	E	E	E
H152 <sup>T</sup>	<i>R. giardinii</i> bv. giardinii	P4	C	C	B	B	A	C	C	no <i>nifH</i>			F	F	F	F

<sup>a</sup> Identical patterns are designated by the same letter for each restriction enzyme. Profiles for the RFLP-PCR of 16S and 23S rRNA genes are shown in figure 3, of *nodC* and *nifH* genes in figure 6, and of the plasmid profiles in figure 7.

## Legend of Figures

Fig. 1. Brazilian states in which the common bean rhizobial strains used in this study were isolated.

Fig. 2. Cluster analysis (UPGMA algorithm with the Jaccard coefficient, converted to percentage similarity) of products obtained by rep-PCR (primers BOX, REP, ERIC) analysis of selected Brazilian strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean and of reference/type strains of described rhizobial species that are microsymbionts of this legume.

Fig. 3. RFLP-PCR profiles of the 16S and 23S rDNA regions of common bean rhizobial strains. (M) represents the 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) and the letters represent the profiles obtained with each restriction enzyme, as described in Table 2.

Fig. 4. Cluster analysis (UPGMA algorithm with the Jaccard coefficient, converted to percentage similarity) of products obtained by RFLP-PCR analysis of the 16S rRNA and 23S rRNA genes with four and three restriction enzymes, respectively. The dendrogram includes Brazilian selected strains very effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean and reference/type strains of described rhizobial species that are microsymbionts of this legume.

Fig. 5. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the Brazilian strains and of the reference/type strains of described rhizobial species that are microsymbionts of common bean. *Rhizobium rhizogenes* (former classified as *Agrobacterium*) was included in the analysis and *Azospirillum brasilense* was used as an outgroup strain. GenBank accession numbers are given in the material and methods section. The tree was generated using MEGA version 3.1 with default parameters, K2P distance model and the Neighbour-Joining algorithm.

Fig. 6. RFLP-PCR profiles of the DNA regions coding for *nifH* and *nodC* genes of common bean rhizobial strains. (M) represents the 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) and the letters represent the profiles obtained with each restriction enzyme, as described in Table 2.

Fig. 7. Plasmid profiles of Brazilian selected strains effective in fixing  $N_2$  with common bean and of reference/type strains of described rhizobial species that are microsymbionts of this legume. The numbers represent the profiles obtained, as described in Table 2.



Fig. 1

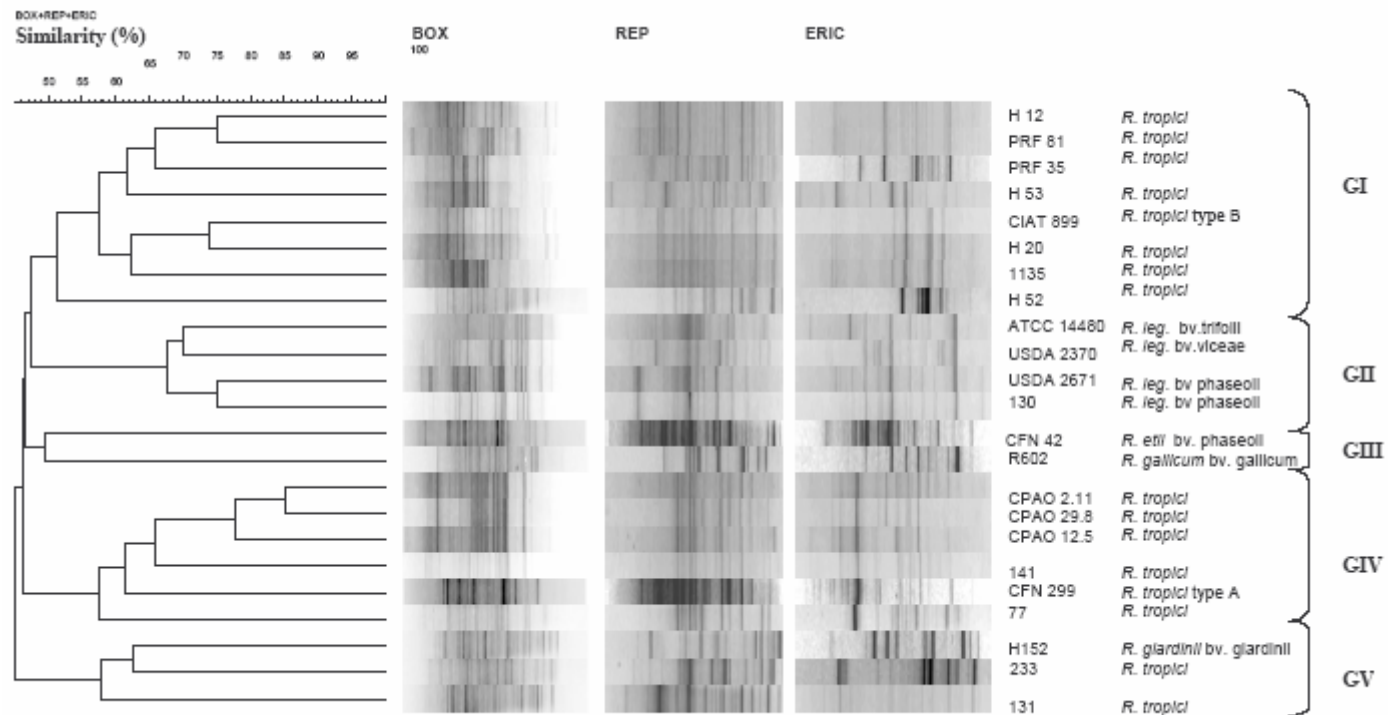


Fig. 2

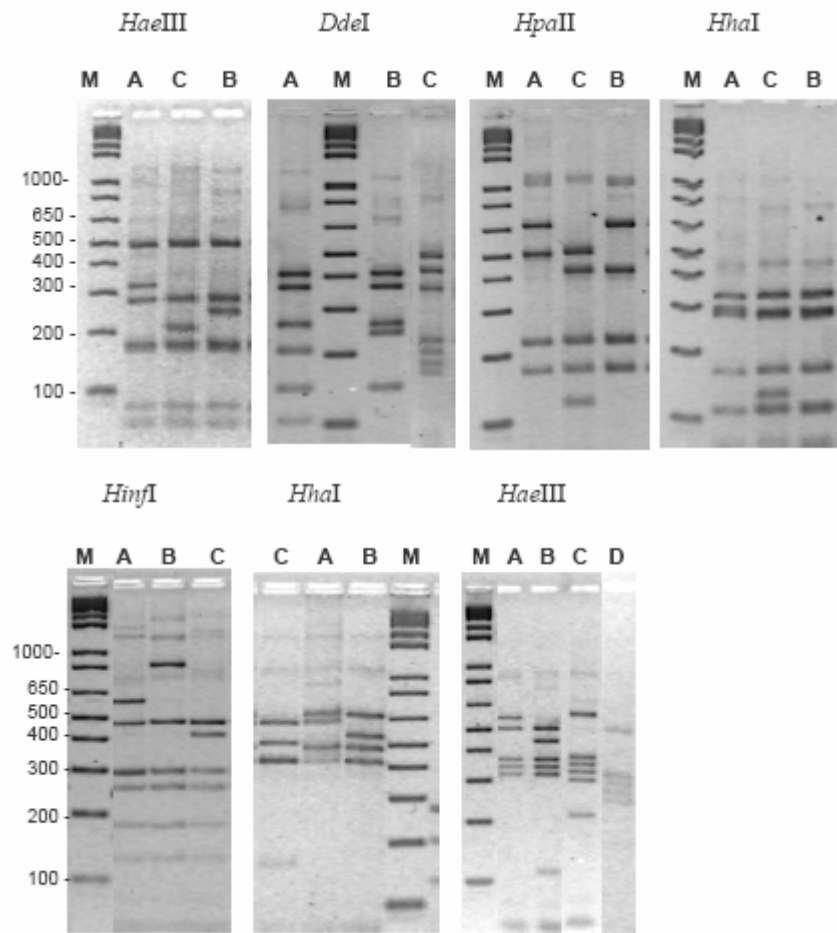


Fig. 3

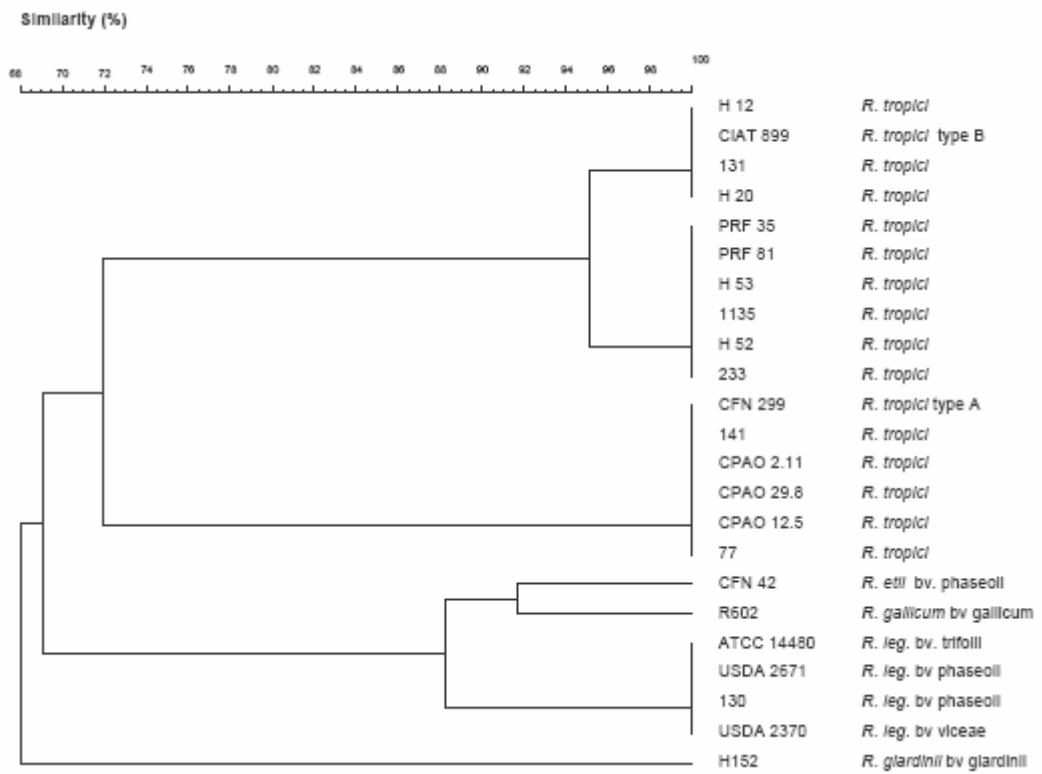


Fig. 4

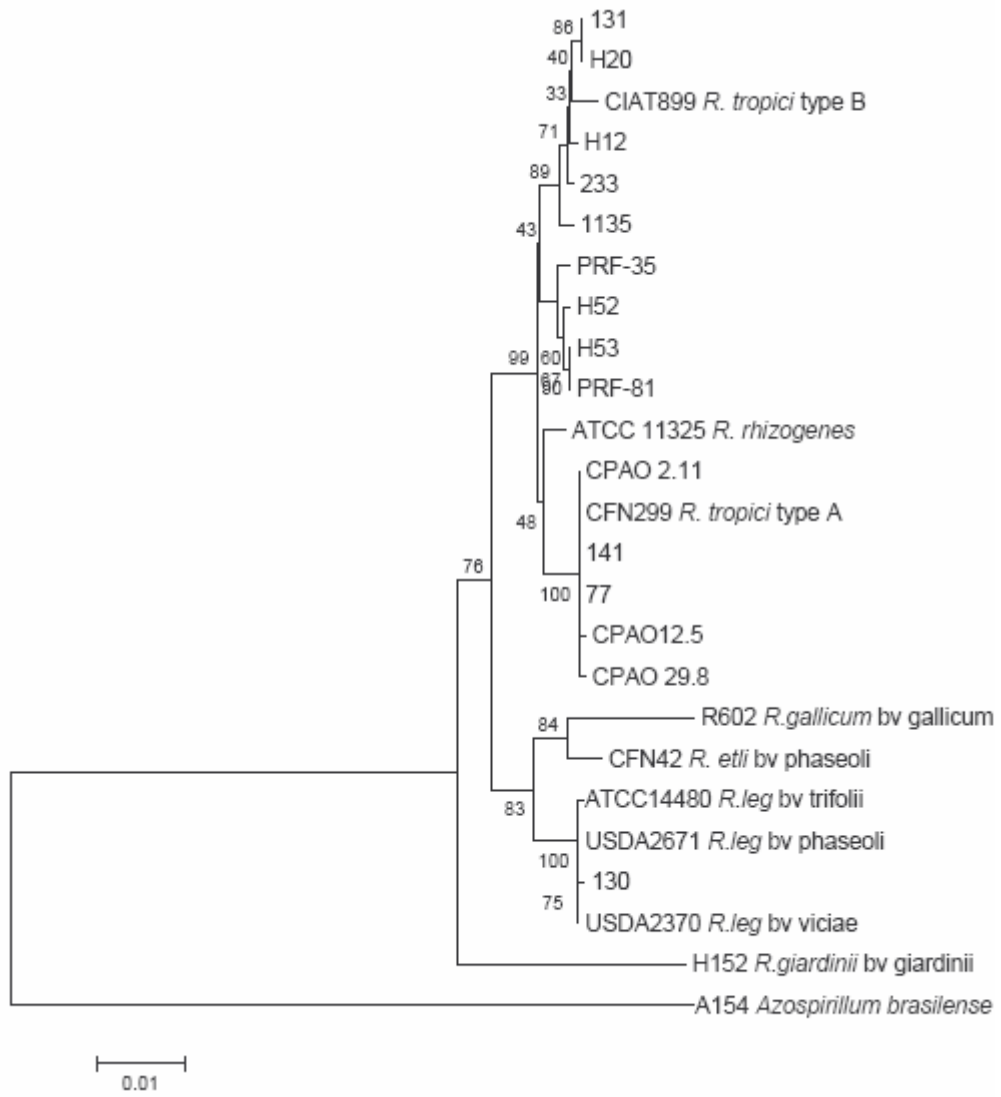


Fig. 5

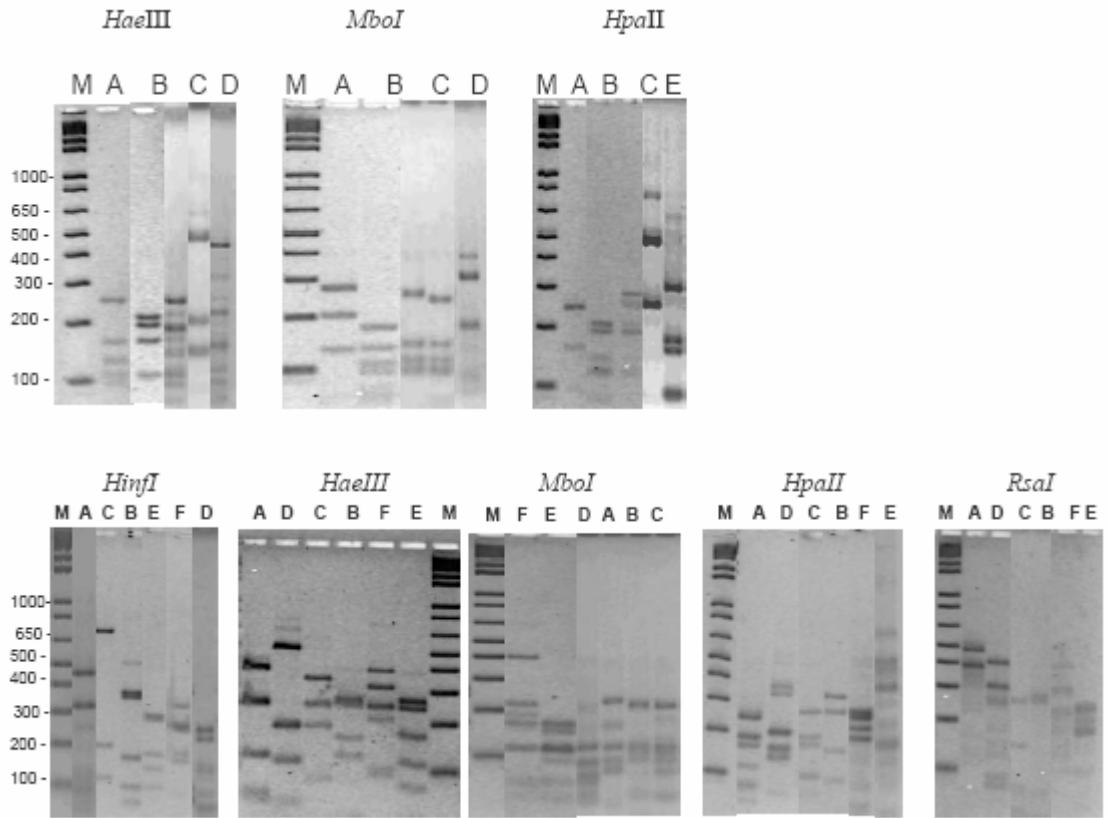


Fig. 6

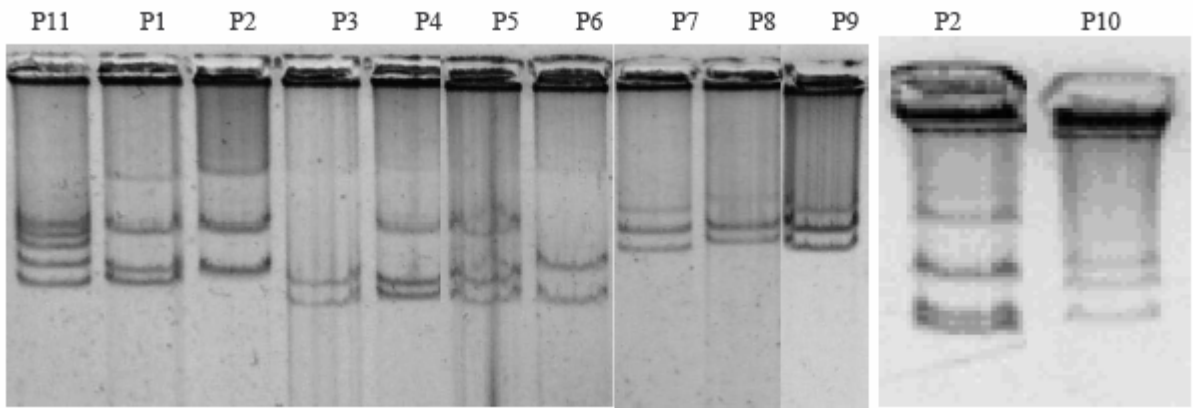


Fig. 7

## ESTUDO 2

### **Panorama genômico e bioprospecção de genes na estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium tropici*, utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**

#### **1. Introdução**

O Brasil é, hoje, o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O rendimento médio nacional é bastante baixo, devido, principalmente, ao baixo nível de tecnologia empregado na cultura e ao cultivo em solos pouco férteis, especialmente pobres em nitrogênio (N). Conseqüentemente, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, pelo processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases de efeito estufa.

A eficiência do processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN) na cultura do feijoeiro tem sido considerada baixa. Tal fato é atribuído a problemas relacionados à nodulação, pela dificuldade de introdução de melhores estirpes e pouca tolerância a estresses ambientais, como temperaturas elevadas e deficiência hídrica. O conhecimento sobre a diversidade dos rizóbios capazes de nodular o feijoeiro em solos brasileiros ainda é pequeno, contudo, nos poucos estudos conduzidos tem-se constatado grande variabilidade fenotípica e genotípica entre as estirpes, inclusive com variabilidade elevada quanto à eficiência no processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> (por exemplo, HUNGRIA et al., 1993; MERCANTE et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999; MOSTASSO et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004). Com base nessa variabilidade, em 1994 foi conduzido um programa de seleção de estirpes, que resultou na identificação da estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium tropici* (HUNGRIA et al., 2000). Em diversos ensaios de campo contendo populações elevadas de estirpes nativas, estimadas em 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, a inoculação com a PRF 81 resultou em incrementos no rendimento de até 900 kg ha<sup>-1</sup>, o que conduziu à recomendação da mesma para o uso em inoculantes comerciais desde 1998 (HUNGRIA et al., 2000; 2003).

Como o Brasil é, hoje, o país que mais utiliza inoculantes com rizóbios, torna-se

importante desenvolver estudos genéticos com estirpes brasileiras. A relevância desses estudos é ainda maior no caso do microssimbionte do feijoeiro, cultura que necessita de impulso tecnológico para incrementar rendimentos a um baixo custo.

Viprey et al., (2000) propuseram uma estratégia de obtenção parcial do genoma, denominada de “panorama genômico”, baseada no seqüenciamento de, aproximadamente, 10% a 15% do genoma. Esses autores conseguiram identificar, utilizando essa estratégia, diversos genes importantes da estirpe NGR234, atualmente classificada como *Sinorhizobium fredii*, caracterizada pela capacidade de nodular várias leguminosas hospedeiras, inclusive, a não leguminosa *Parasponia* sp. A hipótese desse estudo foi de que, utilizando a mesma metodologia de Viprey et al. (2000), seria possível identificar, por homologia com os demais genomas, genes relacionados às altas capacidades competitiva e saprofítica, e à eficiência de fixação N<sub>2</sub> da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*. Pela análise desses genes seria possível, ainda, identificar genes dessa estirpe eficiente e competitiva e que permitam delinear novas estratégias que contribuam para minimizar as limitações à FBN, frequentemente relatadas na simbiose com a cultura do feijoeiro.

## 2. Objetivo

\* Obter o panorama genômico da estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *Rhizobium tropici*, utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Eletroforese em gel de campo alternado (Pulsed Field - PFGE)

O preparo do DNA genômico foi realizado segundo Suzuki et al. (2001), com modificações. A suspensão bacteriana da estirpe PRF 81 foi obtida após o crescimento em meio de cultura, centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e o descarte do sobrenadante. Foram adicionados, à suspensão bacteriana, 250 µL de tampão SET (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 200mM de NaCl, 100mM EDTA), 250 µL de agarose low-melting 1,5% (Bio-Rad, Hercules) e essa mistura foi aplicada em um molde para o preparo dos blocos, os quais foram mantidos a 4°C por 15 minutos, até completa solidificação. Em seguida, os blocos (agarose + células) foram transferidos para uma solução de ruptura ("lise") (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM EDTA, 1M NaCl, desoxicolato de sódio 0,2%, triton X-100 0,5%, laurilsarcosinato de sódio 0,5%, 1mg.mL<sup>-1</sup> lisozima) e incubados a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, a solução de lise foi substituída por tampão SET adicionado de proteinase K (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) e incubada a 50°C por 48 horas. A digestão do DNA genômico com enzima de restrição foi realizada cortando-se os blocos em pequenas secções de 2 -3 mm e incubando-as em fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF) a 0,1 M por 30 minutos, em temperatura ambiente. As secções foram lavadas três vezes em tampão SET por 30 minutos. O tampão foi substituído por 200 µL do tampão 1X, específico da enzima, e os blocos foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. O tampão foi substituído por 100 µL do tampão da enzima acrescentado de 20 U da enzima *SwaI* (New England Biolabs). Os blocos de agarose foram incubados por 12 horas a 25°C para a enzima *SwaI*. Em seguida, foram submetidos à eletroforese em campo pulsado, em gel de agarose a 1,0%, utilizando o aparato CHEF DR III (Bio-Rad), adotando-se as seguintes condições de corrida: pulso constante a 70s, ângulo 120°, temperatura de 14°C, corrida de 18 horas a 6 volts/cm em TBE 0,5X ( Tris base 50 mM, ácido bórico 50mM, EDTA 1 mM, pH 8.5). O tamanho dos fragmentos de DNA foi calculado pelo software BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 1.50), com base na migração em PFGE do DNA cromossomal de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado como padrão de tamanho molecular (Bio-rad).

### 3.2 Extração do DNA genômico

As células da estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) foram obtidas após o crescimento em meio de cultura YM (Vincent, 1970), centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C. O DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método usual descrito por Maniatis et al. (2001). Nesse método, após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes são seletivamente precipitados com o reagente CTAB (“hexadecyltrimethylammonium bromide”, Sigma-Aldrich) e o DNA de alto peso molecular é recuperado do sobrenadante por precipitação com etanol (Merck, para análise, p.a.). O DNA de alto peso molecular e de boa qualidade foi utilizado para a construção das bibliotecas de “shotgun”.

### 3.3 Construção de bibliotecas “shotgun”

Após a purificação do DNA genômico, o DNA foi fragmentado mecanicamente por nebulização (2,0 kgf.cm<sup>-2</sup>). Em seguida, as extremidades dos fragmentos de DNA foram reparadas com a enzima Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Fragmentos com tamanho entre 1,0 - 3,0 kb foram separados em gel de agarose "low melting", grau analítico (Promega) (Fig. 1 - A). Para esta etapa da construção, foram escolhidos os fragmentos de 1,5 a 2,5 kb (Fig. 1 - B). Após a extração dos fragmentos com o “kit” QIAquick Gel Extraction “Kit” (Qiagen), estes foram fosforilados com o uso da enzima “polinucleotide kinase” (PNK) (New England Biolabs). Posteriormente, foi realizada, com o uso da enzima T4 DNA ligase, a ligação ao vetor pUC18, previamente digerido com a enzima de restrição SmaI (Amersham Pharmacia Biotech.) e desfosforilado com a enzima enzima BAP (bacterial alkaline phosphatase) (Promega).

O DNA genômico fragmentado foi também clonado no vetor pCR4Blunt-TOPO, com o uso do “kit” “TOPO Shotgun Subcloning Kit” (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. O DNA clonado foi utilizado para transformação de células de *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen), através da técnica de eletroporação (MANIATIS et al., 2001). Após a eletroporação, as células foram plaqueadas em meio LB (MANIATIS et al., 2001) contendo ampicilina (250 tg.mL<sup>-1</sup>, previamente esterilizada com o uso de filtro 0,2 µm, Millipore), ao qual foram adicionados, por distribuição com alça, 100 tL de IPTG 0,1M e 20 tL de X-Gal 50 tg.tL<sup>-1</sup> e crescidas de 12 a 16 horas a 37°C. Os clones recombinantes produzidos foram

transferidos para placas de crescimento de 96 poços, contendo meio líquido “Terrific Broth” (Invitrogen) suplementado com ampicilina ( $250 \text{ tg mL}^{-1}$ ) e, após crescimento sob agitação por, aproximadamente, 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ , foram mantidos em glicerol a 80% (Sigma,  $>99.5\%$ ) e armazenados a  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.4 Seqüenciamento dos clones

O DNA dos clones recombinantes foi extraído pelo método usual de “lise” (rompimento) alcalina (Maniatis et al., 2001), modificado por Vasconcelos et al. (2003). O DNA purificado foi ressuspensão em água e analisado em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito por Maniatis et al. (2001) (Figura 2). O DNA foi precipitado e submetido ao seqüenciamento com o uso do “kit” —DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR (“polymerase chain reaction”, reação em cadeia da polimerase) foram realizadas com os oligonucleotídeos “Universal” e “Reverso” (Invitrogen ou RW genes), para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes. As seqüências obtidas foram enviadas para a “homepage” <http://www.bnf.lncc.br> e submetidas a um conjunto de programas de alinhamento de seqüências e construção de possíveis “contigs” (Phred, Phrap e Consed).

### 3.5 Montagem e anotação automática de genes

A partir das seqüências submetidas e armazenadas no Laboratório de Bioinformática do LNCC teve início a leitura dos dados (cromatograma) utilizando o programa “Phred”, a montagem inicial das seqüências utilizando o programa “Phrap” (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e a visualização e edição das montagens das seqüências foi realizada usando o programa “Consed” (GORDON et al., 1998, 2001) e “phrapview”.

O programa “Phred” faz a leitura dos dados de sinais de fluorescência oriundos do seqüenciador automático, define as bases (*base-calling*) e atribui valores de qualidade (q) a cada uma das bases através da seguinte fórmula:  $q = -10 \times \log_{10}(p)$ , onde p é a probabilidade

de erro estimado para cada base-call. Somente são aceitas as bases com qualidade de phred  $\Rightarrow$  20, o que significa que serão aceitos apenas 1 erro em 100 bases analisadas. Os valores de qualidade são escritos para arquivos em formato FASTA ou PHD, que podem ser utilizados pelo programa de montagem “Phrap” para aumentar acurácia da seqüência montada. Em seguida, este mesmo programa lê as seqüências dos arquivos de entrada (gerados pelo “Phred”), e os dados dos arquivos de qualidade correspondentes; identifica todos os pareamentos potenciais de seqüências com sobreposição; calcula valores de qualidade ajustados para cada base em cada read e junta vários reads em contigs, começando a partir dos pares com sobreposição que apresentem os maiores valores de LLR (log likelihood ratio) que são a medida de comprimento e qualidade da sobreposição. Posteriormente, é utilizado o programa “Consed” (GORDON et al., 1998; 2001) para visualização e edição de montagens de seqüências feitas pelo programa “Phrap”. Por possuir uma interface gráfica para visualização das montagens é de grande utilidade para análise da qualidade da montagem.

A partir das seqüências consenso obtidas, as regiões codificadoras de genes (CDS, “coding sequences”) presentes no genoma foram identificadas utilizando os programas “Glimmer” (DELCHER et al., 1999) e “GeneMark” de predições de ORF (Open Read Frame). A busca por homologia posteriormente a predição foi realizada, por comparação com o banco de dados de seqüências GenBank, com o uso do conjunto de algoritmos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os bancos de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KANEHISA; GOTO, 2000), COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) (TATUSOV et al., 2000), INTERPRO (uma fonte de busca de famílias, domínios e sítios funcionais de proteínas) (APWEILER et al., 2000; MULDER et al., 2003), PSORT (desenvolvido para localização das proteínas) (NAKAI; KANEHISA, 1991), UniProt/SwissProt (BAIROCH et al., 2006) estão entre aqueles mais usados atualmente para predição da função e topologia de seqüências das proteínas. Todas essas ferramentas de bioinformática que foram utilizadas para a montagem dos “contigs” estão integradas em um “software” para montagem e anotação automática de Genomas: **SABIÁ** System of Automated Bacterial Integrated Annotation (ALMEIDA et al., 2004a,b).

### 3.6 Anotação manual

Após a anotação automática dos "contigs", cada CDS foi anotada manualmente, com base em todas as informações disponibilizadas pelo programa SABIÁ. Na montagem automática, várias ORFs estavam sobrepostas e a validação ou não dessas ORFs foi baseada na análise cuidadosa de todas as informações disponíveis na interface de anotação.

Inicialmente, foram considerados os alinhamentos nos diversos bancos de dados, a qualidade das seqüências e os possíveis "códon" iniciadores de proteínas foram procurados. O próximo passo consistiu na anotação funcional, baseada nas bases de dados COG (genes ortólogos) e KEGG (vias metabólicas). Nessa etapa, são consultados vários bancos, para a identificação dos genes [GeneID (NCBI), GI (NCBI) e UniProt-Swiss-Prot (WU et al., 2006)], bem como bancos específicos de *E. coli*, a bactéria modelo dos genomas de procariotos, incluindo o banco Colibri (Institute Pasteur), Regulon DB (Universidade Autônoma do México) e Wisconsin (com o Institute Pasteur). Ainda com base no banco de dados KEGG, são fornecidas as informações de similaridade com proteínas e ácidos nucléicos. Informações dos bancos InterPro e GO (Gene Ontology) também estão disponibilizadas na interface de anotação.

Uma das consultas mais importantes é a da similaridade de proteínas e de bases de nucleotídeos do GeneBank, no NCBI, pelo conjunto de algoritmos BLAST. Nessa etapa, são verificadas as maiores similaridades com outros organismos, bem como se os genes putativos estão completos, se estes genes são conservados ou hipotéticos, entre outros. Outro banco de grande importância é o UniProt/Swiss-Prot, que apresenta uma detalhada descrição das famílias das proteínas, vias metabólicas, funções, organismo relacionado, topologia da sequência e demais informações relevantes para classificação das proteínas. Finalmente, a localização celular da proteína pode ser predita pelo banco de dados PSORT ou mesmo pelo Uniprot-Swiss-Prot. Famílias de genes ortólogos foram definidas utilizando valores mínimos de "E-value" de  $10^{-5}$ , com pelo menos 60% de cobertura e 50% de identidade.

Somente após a análise cuidadosa de todas as informações disponibilizadas é que a CDS pode ser anotada manualmente, como não válida ou válida. Dentre as CDS identificadas como válidas elas podem ser classificadas em válida propriamente dito (aquelas CDS que apresentam uma função conhecida), hipotética conservada (podem envolver CDS desde indicando um domínio funcional até CDS sem função conhecida também presente em outro genoma) e hipotética = ORFANS ( presentes apenas no genoma estudado).

## 4. Resultados

### 4.1 Estimativa do tamanho do genoma da estirpe PRF 81 de *R. tropici*

Para se obter a estimativa do tamanho do genoma da estirpe PRF 81 de *R. tropici* pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), foi utilizada a enzima *SwaI*. A digestão dos blocos de DNA genômico com essa enzima resultou em 10 fragmentos com tamanhos que variaram de 2.200 kb a 225 kb (Figura 3). A soma dos fragmentos indica que a estirpe PRF 81 apresenta um genoma estimado em 7,85 Mb (Tabela 1). O genoma da estirpe PRF 81 é formado por um cromossomo de 5.305 kb (67,6%) e com base na análise do perfil plasmidial desta estirpe (PINTO et al., 2007) foram identificados 4 plasmídeos com tamanhos em torno de 1700, 510, 185 e 150 kb (2.545 kb) correspondendo a 32,4% do genoma.

### 4.2 Construção de bibliotecas

O DNA genômico da estirpe PRF 81 de *R. tropici* foi utilizado para construir bibliotecas genômicas, principalmente no vetor pUC18, com insertos de, aproximadamente, 1,5 a 2,5 kb. Foram construídas oito bibliotecas genômicas (RTXX01, RTXX02, RTXX03, RTXX05, RTXX06, RTXX07, RTXX09, RTXX11), e validadas apenas sete sendo que a qualidade e as leituras obtidas em cada uma dessas bibliotecas constam no Quadro 1. Para serem validadas as bibliotecas devem obedecer alguns critérios, tais como: que ela seja representativa do genoma, que apresente o tamanho esperado, que não exista contaminação e presença excessiva de vetores.

A validação pode ser feita apenas com uma única placa após a análise de seqüências de vetores, atribuição de qualidade a cada base pelo programa “Phred” e mini-montagem das seqüências com o programa “Phrap” para verificar se não existem muitas sobreposições. A biblioteca RTXX01 não foi validada porque apresentou muitas seqüências de vetores para posterior seqüenciamento e, por isso, resultou no depósito de poucas bases. Somente uma placa desta biblioteca, com 96 clones, foi amplificada com o oligonucleotídeo “Reverso”, seqüenciada e resultou no depósito de 16.408 pb de boa qualidade, sem vetores. As demais bibliotecas foram validadas, por exemplo, a RTXX09, para a qual foram realizadas as leituras de 50 placas e que resultaram em 2.174.920 pb de boa qualidade ( $\geq 20$ ) e sem vetores,

correspondendo a 36,7% de todas as bases depositadas.

O mesmo pode ser observado para outras bibliotecas, indicando que foi obtida uma elevada eficiência na construção e validação das bibliotecas da estirpe PRF81 de *R. tropici*.

#### 4.3 Seqüenciamento dos clones

No início do projeto havia sido proposta a leitura de, aproximadamente, 2.500 clones. Contudo, foram seqüenciados cerca de 4.800 clones, onde foram obtidas reações de seqüenciamento para ambos os oligonucleotídeos, “Universal” e “Reverso”, observando-se, assim, 9.026 leituras (94%), que resultaram em 8.431 (88%) leituras de boa qualidade ( $\geq 20$ ), com poucas bases de vetores ( $\leq 10\%$ ), e um tamanho médio de 501 pb. A leitura desses clones resultou no depósito de 10.046.403 pb, que corresponderiam a 1,28 vezes o genoma, com 45,06% das bases com qualidade  $\geq 20$  e somente 3,57% de bases com vetores (Quadro 2).

Foi previsto o seqüenciamento de bases que corresponderiam a 10 a 15% do genoma da estirpe PRF 81, estimado em 7 a 8 milhões de pb, e confirmado em 7,85 Mb por PFGE . Foram obtidas leituras de qualidade  $\geq 30$  que corresponderiam a 46,24% do genoma. Contudo, pela natureza da biblioteca “shotgun”, em que vários fragmentos correspondem a seqüências idênticas, a cobertura real obtida foi de 27,71% (Quadro 2).

#### 4.4 Montagem e bioprospecção de genes

A montagem inicial do genoma resultou em 1.668 “contigs”, com um número de leituras, em cada um deles, variando de uma a 108 (dados não mostrados). Contudo, a grande maioria dos contigs apresentou entre duas e 23 leituras e somente um último “contig” apresentou 108 leituras.

O consenso foi conseguido através do alinhamento das seqüências geradas com a amplificação dos clones com os “primers” “Universal” e “Reverso”, e com leituras de qualidade phred  $\geq 20$ . Alguns exemplos de “contigs” são apresentados na Figura 4.

Após essa criteriosa anotação manual das CDSs da estirpe PRF 81 de *R. tropici*, foi possível a identificação de 2.192 CDSs das 3972 ORFs geradas pela anotação automática. Dentre elas, 1.255 (57%) foram identificadas como válidas (relacionadas a funções específicas), 668 (31%) como hipotéticas conservadas (presentes também em outros

organismos) e 269 (12%) foram designadas como hipotéticas (encontradas somente em *R. tropici*) (Figura 5).

Segundo a base de dados COG (TATUSOV et al., 1997), foi possível a classificação de 1.612 (73%) CDSs da estirpe PRF 81 de *R. tropici* dentre as 2.192 CDSs identificadas (Tabela 2). Foram encontradas CDSs na maioria das categorias COG e, de modo semelhante ao observado nos genomas de *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* e *R. etli*, várias categorias de COG contêm diversas CDSs relacionadas ao metabolismo e transporte de aminoácidos, metabolismo e transporte de carboidratos e transcrição (COG E, G, e K, respectivamente) (Tabela 2; Figura 6). Em todos os rizóbios analisados a função de, aproximadamente, um terço das CDSs está relacionada às categorias de transporte (E, F, G, I, P e Q), sendo que, em *S. meliloti*, cerca 40% não pode ser classificada nas categorias do COG. Já para *M. loti* MAFF303099 e *B. japonicum* cerca um terço das CDSs também não pode ser classificada nesse banco de dados. Proporcionalmente, *R. tropici* apresentou o dobro de CDSs relacionadas a categoria V, referente aos mecanismos de defesa, quando comparada aos demais rizóbios analisados (Tabela 2).

A classificação funcional das CDSs no banco de dados KEGG demonstrou a presença de genes putativos em todas as classes funcionais. Foi possível somente a classificação de 1.013 CDSs (40%) nas categorias do KEGG, sendo que o maior número de CDSs validados foi relacionado ao metabolismo de aminoácidos (11%), de carboidratos (8,3%) e de lipídios (2,9%) (Figura 7).

Algumas observações devem ser destacadas com base no banco de dados KEGG, por exemplo, o elevado número de CDSs relacionadas à biodegradação de xenobióticos (2,8%), particularmente do benzoato (39 CDSs). Foram identificadas CDSs relacionadas à degradação de benzoato (*pcaB*, *pcaC*, *pcaD*, *pcaG*, *pcaH* e *adhA*, entre outras) pertencentes às duas principais vias: via ligação CoA, (com 25 CDSs), e via de hidroxilação (com 14 CDSs) (Figura 8).

É importante destacar, ainda, a presença de três proteínas de secreção do tipo II: duas relacionadas à presença de “pili” (*cpaD* e *cpaF*) e uma a “fimbriae”; seis do tipo III, relacionadas à biossíntese de flagelos (tais como: *fliF*, *fliP*, *fliR* e *flhA*) e quatro do tipo IV, relacionadas à proteínas de transferência de conjugação: *traG*, apresentando similaridade elevada com *S. meliloti*, *trbI* (*vir10*), com similaridade com *A. tumefaciens*; *trbD* (*virD4*) e *trbL* (*virB6*), com maior similaridade com *R. etli*.

Também foram identificadas, na estirpe PRF 81, CDSs relacionadas à fixação biológica de N<sub>2</sub> (*nifN*, *nifR*, *nifS*, *nifU*, *nifW*, *fixA*, *fixB*, e *fixR*) e à regulação da expressão

desses genes (*nifA*, *ntrB*, *ntrC*, *ntrX* e *ntrY*). Além disso, foram identificadas CDSs relacionadas ao processo de nodulação, destacando-se: *nodC*, responsável pela biossíntese da estrutura básica do fator *Nod*; *nodG*, *nodN*, *nodS* e *nodU*, que produzem as modificações na estrutura do fator *Nod*; *nodI*, *nodJ*, *nodT*, *nolF* e *nolG*, responsáveis pelo transporte e exportação de fatores de nodulação. A maioria apresentou similaridade elevada com a estirpe tipo *R. tropici* CIAT 899, com exceção de *nodG* e *nodJ* que foram mais semelhantes a *R. leguminosarum* e *nolF* e *nolG* que apresentaram maior similaridade com *S. meliloti*.

Além das CDSs acima citadas, foi identificado um elevado número de CDSs pertencentes a "operons" relacionados a diversas funções celulares, destacando-se: transportadores (*bra*, *ars*, *arg*, *cut*, *cob*, *sec*, *pep*, *phn*, *ssu*); biossíntese de exopolissacarídeos (*exo*); biossíntese de cofatores (*thi*); biossíntese de proteínas ribossomais (*rbs*); proteção a estresse oxidativo (*sox*); resistência a diferentes drogas (*acr*, *omp*), catabolismo de rizopinas (*moc*). Pode-se citar, ainda, como exemplo entre as CDSs validadas, a proteína regulatória P-II e as proteínas "heat shock" ClpX e Clp2 .

## 5. Discussão

Neste estudo, procedeu-se ao seqüenciamento e à bioprospecção parcial de genes da estirpe PRF 81 de *R. tropici*. Com o uso da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), a partir do DNA total clivado com uma enzima de restrição de corte raro (*SwaI*), foi possível obter uma estimativa do tamanho do genoma da estirpe PRF 81 de *R. tropici* em, aproximadamente, 7,85 Mb, sendo que 5.305 kb (67,6%) correspondem ao cromossomo e 2.545 kb (32,4%) a plasmídeos. Em comparação aos outros rizóbios já seqüenciados, *R. tropici* apresenta um genoma maior que *R. tumefaciens* (anteriormente *Agrobacterium*) (5,67 Mb, WOOD et al., 2001), *R. etli* (6,53 Mb, GONZÁLEZ, et al., 2006), *S. meliloti* (6,69 Mb, GALIBERT et al., 2001), *M. loti* (7,6 Mb, KANEKO et al., 2000) semelhante à espécie *R. leguminosarum* (7,79 Mb, YOUNG et al., 2006) e inferior à (9 Mb, KANEKO et al., 2002). O tamanho do genoma da estirpe PRF 81 deve ser confirmado com o seqüenciamento completo do genoma.

A classificação da maioria das CDSs (73%) de *R. tropici* no banco de dados COG permitiu a análise comparativa dos dados dessa bactéria com outros rizóbios já seqüenciados, como: *S. meliloti*, *M. loti*, *B. japonicum* e *R. etli*. Foi observada uma distribuição semelhante dos genes putativos em todos os rizóbios, para a maioria das categorias analisadas, exceto para a categoria G (transporte e metabolismo de carboidrato), que em *B. japonicum* (3,5%) foram inferiores, em comparação com essa categoria nos demais rizóbios (Tabela 2). A semelhança na distribuição da CDSs de PRF 81 em todas as categorias sugere que o número de seqüências obtidas foi suficiente para representar o genoma dessa estirpe.

Demonstrou-se a presença de genes putativos em todas as categorias funcionais no banco de dados KEGG, embora somente 40% das CDSs de *R. tropici* tenham sido classificadas nessas categorias. Das 71 CDSs relacionadas à biodegradação e xenobióticos, 39 delas foram referentes à degradação do benzoato, que é um composto intermediário da degradação de bifenis policlorinados (PCBs). Os PCBs são compostos organoclorados com várias aplicações industriais, como óleos hidráulicos, ou em sistemas de refrigeração, transformadores, capacitores e outros equipamentos elétricos, como isolantes térmicos. Devido a sua elevada estabilidade química e térmica, bem como por ser pouco solúvel em água e lipofílico, é considerado altamente tóxico à maioria dos organismos e, também persiste muitos anos à degradação sofrendo processos de bioacumulação e causando sérios problemas ambientais (SAFE, 1994). Em estudos recentes com *Burkholderia xenovorans* LB400 (anteriormente *Pseudomonas*), uma estirpe potencialmente degradadora de PCBs, as vias de

degradação de benzoato foram melhor caracterizadas, sugerindo que diferentes vias são utilizadas, dependendo da fase de crescimento e do tipo de substrato utilizado (DENEFF et al., 2005). Dos 39 genes putativos que foram identificados na estirpe PRF 81, 25 deles pertencem ao catabolismo do benzoato via ligação CoA e 14 via hidroxilação, por exemplo, as CDSs, *pcaB*, *pcaC*, *pcaD*, *pcaG* e *pcaH* participam da clivagem do catecol, no processo de degradação do benzoato (DENEFF et al., 2005) (Figura 8).

As CDSs referentes a *pcaB*, *pcaC*, *pcaG* e *pcaH* apresentaram maior similaridade com *S. meliloti* e a *pcaD* com a estirpe NGR234. Contudo, todos os genes putativos *pcaB*, *pcaC*, *pcaD*, *pcaG* e *pcaH*, também foram identificados em outros rizóbios sequenciados, como *R. etli*, *R. leguminosarum* e em *B. japonicum*, exceto em *M. loti*. Nos rizóbios já sequenciados estes genes estão organizados em 2 unidades transcricionais (operons), *pcaDCHGB* e *pcaIJF* (PARKE et al., 1995; MACLEAN et al., 2006) sendo que em *S. meliloti* estão agrupados muito próximos no pSymb, além de serem regulados semelhantemente ao observado para *A. tumefaciens* (MACLEAN et al. 2006).

Embora não tenham sido identificados todos os genes envolvidos na degradação do benzoato, foi observado que as CDSs identificadas codificam enzimas-chave para a degradação deste composto intermediário dos PCBs. A presença desses genes putativos reflete a versatilidade metabólica da estirpe PRF 81, sugerindo que essa bactéria possa utilizar as vias de degradação de benzoato como aporte secundário para obtenção de fonte de C e energia, auxiliando, assim, sua persistência e sobrevivência no solo, em condições ambientais desfavoráveis. Portanto, esses genes também podem estar relacionados à adaptabilidade e à capacidade competitiva elevada observada na estirpe PRF 81.

Foram identificadas seis CDSs (*cpaD*, *cpaF*, *fliF*, *fliP*, *fliR* e *flhA*) relacionadas aos sistemas de secreção dos tipos II e III, todas apresentando similaridade elevada com *R. tumefaciens*. Os genes *cpaD*, *cpaF* e *flhA* foram identificados em *M. loti*, *S. meliloti*, *R. etli* e *R. leguminosarum*. Quanto aos genes *fliF*, *fliP* e *fliR* além de estarem presentes nos quatro rizóbios citados, foram identificados também em NGR234 (*fliF*), em *B. japonicum* (*fliP*) e em NGR 234 e *B. japonicum* (*fliP*).

O sistema T3SS (sistema de secreção do tipo III) é induzido pelo contato com células hospedeiras e libera os chamados fatores ou proteínas de “virulência” diretamente no citosol eucariótico (YIP et al., 2006). O T3SS completo é formado por 20 proteínas que formam um complexo interligado às membranas interna e externa da bactéria e é por onde ocorre o trânsito de moléculas, sem sofrerem clivagem proteolítica, para o interior da célula hospedeira (MARIE et al., 2003). As substâncias secretadas (proteínas e polissacarídeos) pelo T3SS

podem ser reconhecidas pela planta hospedeira como componentes da via de infecção e reagem a sua presença com um aumento na nodulação. Uma explicação plausível para isso é que essas substâncias secretadas funcionem como supressores dos mecanismos de defesa da planta (NIEHAUS et al., 1993; PERRET et al., 2000). Este sistema de secreção já foi identificado nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e em *S. meliloti* (MARIE et al., 2001).

Em *Rhizobium*, a indução de formação de nódulos é co-regulada com a expressão dos genes de secreção do tipo III (T3S) sugerindo que as proteínas secretadas desempenham um papel importante no processo de nodulação e contribuem com o estabelecimento da simbiose com rizóbio-leguminosa (VIPRET et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2003; BUTTNER; BONAS, 2006). Estudos genéticos, bioquímicos e estruturais revelaram que pelo menos nove componentes do T3SS são conservados entre bactérias simbióticas e patogênicas, sugerindo que a arquitetura básica do T3SS é regulada por mecanismos comuns em diferentes bactérias, embora, estes mecanismos ainda não estejam bem elucidados (MARIE et al., 2001, 2003, BUTTNER; BONAS, 2006).

Na estirpe PRF 81 foram identificados quatro genes putativos, (*traG*, *trbI*, *trbL* e *trbD*) do sistema de secreção tipo IV (T4SS), relacionados a proteínas de transferência de conjugação, com similaridade elevada com *S. meliloti* (*traG*), NGR 234 (*trbI*) e *R. etli* (*trbL* e *trbD*). Na estirpe- tipo de *R. etli*, CFN 42, os genes *virB1-virB11*, relacionados ao T4SS foram localizados no plasmídeo simbiótico p42d. Embora o p42d não seja um plasmídeo auto-conjugativo, foram encontrados os genes *traACD* e o pseudogene *traI* truncado, sugerindo que este plasmídeo pode ter perdido a capacidade de auto-conjugação (GONZÁLEZ et al., 2003).

As CDSs relacionadas ao T4SS encontradas em *R. tropici* apresentam similaridade elevada, de cerca de 80% com os genes *vir* de *A. tumefaciens*, responsáveis pelo desenvolvimento da doença “galha-da-coroa” em plantas, sugerindo uma estreita relação entre o estabelecimento da simbiose e os processos de patogenicidade (virulência) observados nessas bactérias. Contudo, ambos os sistemas, T3SS e T4SS podem ser encontrados, completos ou truncados parcialmente, em outros patógenos bacterianos de plantas e animais, tais como *Brucella melitensis* 16M (O’CALLAGHAN et al., 1999), *Caulobacter crescentus* CB15 (NIERMAN et al., 2001), *Xanthomonas citri* 306 (da SILVA et al., 2002) enquanto em *Rickettsia prowazekii* Madrid E, alguns genes *virB* são conservados (ANDERSON et al., 1998). Já a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 contém o, T3SS completo com os 20 componentes protéicos, mas perdeu os homólogos do T4SS, enquanto em *Xilella fastidiosa* 9a5c foram encontradas nove proteínas de conjugação ortóloga no plasmídeo

pXF41, que correspondem aos genes *virB* encontrados em outros microorganismos (GONZÁLEZ et al., 2003).

O papel do T4SS no desenvolvimento de doenças em plantas está bem estabelecido para *R. tumefaciens* (ZHU et al., 2000) e, apesar da identificação de T4SS em outros fitopatógenos, como *X. citri* (da SILVA et al., 2002) e *X. fastidiosa* (SIMPSON et al., 2000), sua função na promoção da doença causada por estes agentes ainda não está bem estabelecida (ALEGRIA et al., 2005).

Quanto às CDSs relacionadas ao processo de nodulação, cinco delas (*nodC*, *nodN*, *nodS*, *nodU* *nodI*, e *nodT*) apresentaram similaridade elevada com a estirpe tipo de *R. tropici*, CIAT 899, duas (*nodG* e *nodJ*) com *R. leguminosarum* e outras duas (*nolF* e *nolG*) com *S. meliloti*. Manyani et al (2001) determinaram a organização dos genes *nodHPQ* na estirpe CIAT 899 e verificaram que os mesmos pertencem ao operon *nodABCSUIJ*. Foram encontrados homólogos desses genes na maioria dos rizóbios seqüenciados, sendo que *nodC*, *nodI* e *nodJ* foram encontrados em todos os rizóbios seqüenciados, *M. loti*, *B. japonicum*, *S. meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* e NGR234; *nodS* e *nodU* foram identificados em todos os rizóbios, exceto em *R. leguminosarum* (YOUNG et al., 2006); *nodN* foi encontrado em todos os rizóbios, exceto em NGR234 (Freiberg et al., 1997); *nodG* foi identificado em *M. loti*, *S. meliloti*, *R. etli* e *R. leguminosarum*; *nodT* foi identificado em *M. loti*, *R. etli* e *R. leguminosarum* e finalmente *nolF* e *nolG* foram encontrados somente em *S. meliloti*.

Desse modo, na estirpe PRF 81 foram identificados genes putativos responsáveis por modificações no esqueleto do fator Nod, destacando-se o *nodS* (metilação) e o *nodU* (carbamilação), que conferem especificidade na interação com hospedeiro, semelhante ao observado em *R. tropici* CIAT 899 (WAELKENS et al., 1995). Os fatores Nod produzidos pelos rizóbios, em resposta a compostos exsudados pela planta hospedeira, são moléculas chave no estabelecimento da simbiose e, embora o feijoeiro seja considerada uma planta promíscua, por ser capaz de reconhecer uma ampla gama de fatores Nod, existe uma hierarquia de preferência, onde a acetil-fucose no extremo redutor é preferida sobre as demais modificações (LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998). Foi verificado que, para *R. tropici* estirpe CIAT 899, o gene *nodS* é indispensável para a nodulação, tanto do feijoeiro (LÓPEZ-LARA et al., 2001), como de *Leucaena leucocephala* (WAELKENS et al., 1995), enquanto que o gene *nodU* promove um decréscimo na nodulação de *Leucaena*, mas não interfere na nodulação do feijoeiro. A introdução do operon *nodABCSU* da CIAT 899 em *R. etli* CE-3, que é uma estirpe que nodula somente o feijoeiro, amplia a capacidade de nodulação, para *Leucaena leucocephala* (WAELKENS et al., 1995).

Foram identificados genes putativos (*nodT*, *nodJ*, *nodI*) que codificam um complexo de proteínas de membrana relacionadas ao transporte dos fatores Nod para fora da célula, além dos genes *nolG* e *nolF*, cujos homólogos em *S. meliloti* apresentam função também relacionada a exportação de substratos através das membranas desta bactéria (SAIER et al., 1994; BARNETT et al., 2001). Em estudos com mutantes do gene *nodI* em *R. tropici* CIAT 899, foi observado que os mesmos secretam fatores Nod não sulfatados e dependem diretamente da expressão da proteína regulatória NodD dessa estirpe (MANYANI et al. 2001). A função desses genes ainda não está bem estabelecida em *R. tropici*, mas em *S. meliloti* sabe-se que a ausência dos mesmos não inviabiliza o estabelecimento da simbiose, mas interfere na eficiência do processo de nodulação (SAIER et al., 1994).

Na fixação biológica do N<sub>2</sub> têm sido identificados vários genes, como os genes *nif*, que são homólogos aos encontrados em *Klebsiella pneumoniae*, e requeridos para a estrutura, biossíntese e regulação da enzima nitrogenase. Já os genes *fix* são encontrados em adição aos genes *nif*, mas sem homologia com genes de *K. pneumoniae*. Ambos podem ser encontrados em organismos associativos, endofíticos e de vida livre. Na estirpe PRF 81 foram identificados seis genes *nif* (*nifA*, *nifN*, *nifR*, *nifS*, *nifU* e *nifW*), e três genes *fix* (*fixA*, *fixB* e *fixR*) sendo que os genes *nifA*, *nifN*, *nifS*, *nifW* e *fixA* apresentaram similaridade elevada com *M. loti*, *nifR* e *fixB* com *R. etli* e *fixR* com *S. meliloti*.

Os genes *nifN*, *nifS* e *nifU* codificam produtos envolvidos na biossíntese do co-fator Fe- Mo e *nifW* está relacionado à estabilidade da nitrogenase (KAMINSKI et al., 1998). Já os genes putativos *fixA* e *fixB* fazem parte do operon *fixABCX*, sendo responsáveis por codificar as subunidades de flavoproteína (EARL et al., 1987; GONZÁLEZ et al., 2003). Além disso, foram identificados os genes *ntrBC* e *ntrXY*, responsáveis pela regulação da utilização de fontes alternativas de nitrogênio (nitrato e aminoácidos) (GALIBERT et al., 2001) e os genes *nifA* e *nifR* que codificam proteínas regulatórias da fixação biológica do N<sub>2</sub> (MERRICK, 1988; GONZÁLEZ et al., 2003). Esses sistemas de regulação envolvidos no processo de fixação biológica do N<sub>2</sub> têm por finalidade regular a fixação ou inibir a expressão dos genes *nif*, de acordo com a presença ou ausência de uma quantidade adequada de oxigênio (O<sub>2</sub>), uma vez que o complexo da nitrogenase é muito sensível ao O<sub>2</sub>, podendo ser irreversivelmente inativado pela exposição aos níveis atmosféricos desse gás (MERRICK, 1988).

*R. tropici* é uma bactéria que tem sido isolada de *Phaseolus vulgaris* cultivado em regiões tropicais e, como outros microrganismos de vida livre, está exposta a uma série de condições ambientais desfavoráveis, como escassez de nutrientes, altas temperaturas (às vezes superiores a 40°C), e altos níveis de radiação. Essas variações requerem respostas adaptativas

rápidas, normalmente ativando mecanismos de transcrição de genes específicos. Na estirpe PRF 81, além da RNA polimerase e os fatores sigma,  $\sigma^{24}$  (rpoE),  $\sigma^{54}$  (rpoN),  $\sigma^{32}$  (rpoH), está presente um grande número de ativadores e repressores transcricionais que interagem com fatores sigma alternativos envolvidos na resposta bacteriana ao estresse, dentre essas proteínas reguladoras estão: 12 LysR, 8 AraC, 6 GntR, 4 OmpR, 3 TetR, 3 ArsR, 2 DeoR, 2 MarR, 2 IclR, 1 SoxR, 1 PurR, 1 AcrR, e duas proteínas de “cold shock” (*cps4* e *cpsA*). Cerca de 60% dessas CDSs demonstraram elevada similaridade com reguladores de transcrição descritos em *S. meliloti*, e o restante com *M. loti* ou *R. tumefaciens*. Comparando os genes envolvidos na transcrição de *R. etli* CFN 42, com *R. tropici*, e assumindo que um número maior de reguladores indicaria um maior número de vias metabólicas, podemos inferir que o elevado número de reguladores transcricionais encontrado, pode estar relacionado à alta capacidade de sobrevivência dessas bactérias em condições ambientais desfavoráveis (GONZÁLEZ, et al., 2006).

A diversidade das vias metabólicas é outro fator que indica a elevada adaptabilidade de *R. tropici*, sendo que foram identificadas, pelo banco de dados KEGG, 626 CDSs relacionadas ao metabolismo central e intermediário, incluindo a síntese e catabolismo dos vinte aminoácidos bem como de cofatores, vitaminas e nucleotídeos (purinas e pirimidinas). Além disso, foram identificados 75 genes putativos relacionados à síntese e degradação de diferentes lipídeos (triacilglicerol, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos), que podem ser utilizados como fonte de energia suplementar, na síntese de membranas ou como reserva energética (GONZÁLEZ et al., 2003).

A capacidade de crescimento que a espécie *R. tropici* apresenta em temperaturas elevadas (40°C) talvez possa ser explicada, pela presença de genes putativos de proteínas “heat shock” (*clpX* e *clp2*), que foram identificados na estirpe PRF 81. A identificação das CDSs *uvrAB* e *uvrD*, também presente em outros rizóbios, *B. JAPONICUM* (KANEKO et al., 2002), *R. etli* (GONZÁLEZ et al., 2006), *S. meliloti* (GALIBERT et al., 2001) e *R. leguminosarum* (YOUNG et al., 2006) pode estar relacionada a tolerância à radiação ultravioleta (UV), como observado para a bactéria *Chromobacterium violaceum* (VASCONCELOS et al., 2003).

As CDSs identificadas na estirpe PRF 81 que foram classificadas no banco de dados KEGG, quando comparadas a outros organismos, apresentaram maiores semelhanças com genes presentes em diversas espécies, sugerindo que esta estirpe é composta por um mosaico de genes de diferentes espécies, como por exemplo, os genes do sistema de secreção tipo IV (T4SS), (*traG*, *trbI*, *trbL* e *trbD*) relacionados a proteínas de transferência de conjugação,

apresentaram similaridade elevada com distintos rizóbios, tais como: *S. meliloti* (*traG*), NGR 234 (*trbI*) e *R. etli* (*trbL* e *trbD*).

As 1.255 CDSs validadas na estirpe PRF 81 apresentaram maior similaridade com *R. leguminosarum* (29%), seguido de *R. etli* (20%), *S. meliloti* (8%), *A. tumefaciens* (6,2%), *M. loti* MAFF303099 (4,7%), *B. japonicum*; (1,3%) e com demais organismos a semelhança foi inferior a 1% (Figura 9). Na estirpe PRF 81 de *R. tropici* foi observado que os genes putativos (*pcaB*, *pcaC*, *pcaG* e *pcaH*), relacionados a categoria funcional do KEGG de biodegradação de xenobióticos, apresentaram maiores semelhanças com *S. meliloti*. Contudo, todos esses genes também foram identificados nos outros rizóbios seqüenciados, porém com menor similaridade, como observado em *R. etli*, *R. leguminosarum* e em *B. japonicum*, exceto em *M. loti*. Além disso, também foram identificados seis genes putativos (*cpaD*, *cpaF*, *fliF*, *fliP*, *fliR* e *flhA*) relacionados a classe dos sistemas de secreção dos tipos II e III, todos apresentando similaridade elevada com *A. tumefaciens*.

A partir da análise comparativa da similaridade das CDSs, do banco de dados KEGG, dos genomas dos rizóbios, (*R. tropici*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *M. loti*, *S. meliloti* e *B. japonicum*) observou-se que *S. meliloti* apresentou uma distribuição percentual das CDSs semelhante ao observado para *R. tropici* (Figura 9 e 10), sendo as maiores semelhanças encontradas em *R. leguminosarum* (23,2%), seguido de *R. etli* (18,5%), *A. tumefaciens* (14,5%), *M. loti* (7,5%) e *B. japonicum* (1,4%) (Figura 10).

As maiores similaridades nos genomas foram observadas entre *R. etli* (80%) (Figura 11) com *R. leguminosarum* e do *R. leguminosarum* (Figura 12) (62,9%) com *R. etli*. A elevada similaridade entre esses dois genomas era esperada, uma vez que, anteriormente, a espécie *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993) foi descrita incluindo as estirpes anteriormente classificadas como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* do tipo I de origem americana (MARTÍNEZ et al., 1988), as quais constituem um biovar, *R. etli* bv. *phaseoli* e isolados não simbióticos originários do México (SEGOVIA et al., 1991). Todas as estirpes do grupo de *R. etli* são distingüíveis das outras espécies, em nível molecular, pelos resultados de teste de hibridização do DNA total, perfis enzimáticos de eletroforese e seqüências de genes ribossomais (SEGOVIA et al., 1993).

De todos os rizóbios pertencentes à classe *Alphaproteobacteria*, o *B. japonicum* é o que apresenta o maior tamanho de genoma (9Mb) até hoje seqüenciado, e demonstra as maiores similaridades com outros organismos que não os rizóbios, tais como: *Nitrobacter hamburgensis* e *Rhodopseudomonas palustris* (Figura 13). Com os demais rizóbios seqüenciados apresenta baixa similaridade, por exemplo, com *M. loti* (4%), *R. leguminosarum*

(2,47%), *S. meliloti* (1,62%) e *R. etli* (0,97%) (Figura 13).

Baseado na comparação dos genomas dos rizóbios já seqüenciados (*S. meliloti*, *B. japonicum*, *M. loti*, *A. tumefaciens*, *R. leguminosarum* bv viceae, NGR 234 e *R. etli*), as regiões simbióticas desses organismos são muito heterogêneas em relação às seqüências, à composição e à localização dos genes (cromossomo ou plasmídeos). Na estirpe PRF 81 de *R. tropici*, os genes e as regiões envolvidas no estabelecimento da simbiose, na nodulação e fixação do nitrogênio compõem mosaicos com grande diversidade e que, assim como observado para os demais rizóbios, podem estar sofrendo modificações como consequência de transposição, recombinação e eventos de transferência lateral de genes (FREIBERG et al., 1997; GONZÁLEZ, et al., 2003).

A identificação de um grande número de CDSs pertencentes as principais categorias funcionais do KEGG, a partir do seqüenciamento de 27,71% do genoma da estirpe PRF 81, confirma que a estratégia utilizada para a detecção de genes de *R. tropici*, mostrou-se confiável e adequada. Desse modo, a bioprospecção dos genes de *R. tropici* estirpe PRF 81 permitiu a identificação de genes relacionados à adaptabilidade, à competitividade e à fixação biológica do N<sub>2</sub> e, a partir desses resultados, foi possível identificar atributos diferenciais desse microssimbionte do feijoeiro.

## 6. Conclusões

\* O tamanho do genoma da estirpe PRF 81(=SEMIA 4080) de *R. tropici* foi estimado em 7,85 Mb pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);

\* A semelhança na distribuição das CDSs da PRF 81 no banco de dados COG com os demais rizóbios, sugere que o número de seqüências obtidas foi suficiente para representar o genoma dessa estirpe;

\* Foram identificados genes putativos em todas as classes funcionais do banco de dados KEGG, obtendo-se um elevado número destes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, destacando-se os genes relacionados à biodegradação de xenobióticos, além de genes relacionados à capacidade competitiva, saprofítica e ao processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>;

\* A estratégia de panorama genômico mostrou-se viável e eficiente para visualizar a distribuição dos genes no genoma da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*, utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro no Brasil.

## 7. Referências Bibliográficas

ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; DA SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. Identification of New Protein-Protein Interactions Involving the Products of the Chromosome- and Plasmid-Encoded Type IV Secretion Loci of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2315-2325, 2005.

ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A new set of bioinformatics tools for genome projects. **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.26-52, 2004a.

ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; BARRIENTOS, J. A.; SANTOS, M. T.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A system for automated bacterial (genome) integrated annotation  $\alpha$  SABIA. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2832-2833, 2004b.

ANDERSSON, S. G. E.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSSON, J. O.; SICHERITZ-PONTEN, T.; ALSMARK, U. C. M.; PODOWSKI, R. M.; NASLUND, A. K.; ERIKSSON, A. S.; WINCKLER, H. H.; KURLAND, C. G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**, v. 396, p. 133-140, 1998.

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4025-4034, 2002.

APWEILER, R.; ATTWOOD, T. K.; BAIROCH, A. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Bioinformatics**, v. 16, p.1145-50, 2000.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 193-200, 2006.

da SILVA, A. C.; J. A. FERRO, F. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DELCHER, A. L.; HARMON, D.; KASIF, S.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 4636-4641, 1999.

DENEFF, V. J.; PATRAUCHAN, M. A.; FLORIZONE, C.; PARK, J.; TSOI, T.; VERSTRAETE, W.; TIEDJE, J. M.; ELTIS L. D. Growth Substrate- and Phase-Specific Expression of Biphenyl, Benzoate, and C1 Metabolic Pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. **Journal of Bacteriology**, v. 100, p. 11660-11665, 2003.

EARL, C. D.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 1127- 1136, 1987.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, 1997.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M., et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v.293, p.668-672, 2001.

GONZÉLEZ, V.; BUSTOS, P. et al. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. **Genome Biology**, v.4, R36.1-13, 2003.

GONZÉLEZ, V.; SANTAMARIA, R. I. et al. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 3834-3839, 2006.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research**, v. 11, p. 614-625, 2001.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36, p. 1389-1398, 2004.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, 2006. (aceito)

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUITIERREZ- MANERO, F. J.; MEGÈAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, p.1515-1528, 2000b.

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

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors impacting N<sub>2</sub> fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000a.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., (eds.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p 189-294.

KAMINSKI, P. A.; BATUT, J.; BOISTARD, P. A survey of symbiotic nitrogen fixation by Rhizobia. In: Spaink, H. P.; Kondorosi, A.; Hoykaas, P. J. J. (eds.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academy Publishers, 1998, p. 431-460,

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 29-34, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y., et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7, p. 331-338, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y., et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, p. 189- 197, supplement p. 225-256, 2002.

LAEREMANS T., VANDERLEYDEN, J. Review: infection and nodulation signalling in Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 787-808, 1998.

MACLEAN, A. M.; MACPHERSON, G.; ANEJA, P.; FINAN, T. M. Characterization of the  $\beta$ - KETOADIPATE Pathway in *Sinorhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5403-5413, 2006.

MANIATIS, T.; SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3<sup>rd</sup> (eds.) Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

MANYANI, H.; SOUSA, C.; D'ÁZ, M. E. S.; GIL-SERRANO, A.; MEGÈAS, M. Regulation of Nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 574-579, 2001.

MARIE, C.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers?. **Current Opinion of Plant Biology**, v. 4, p. 336-342,

2001.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterization of Nops, Nodulation Outer Proteins, Secreted Via the Type III Secretion System of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 743-751, 2003.

MARTÈNEZ, E.; FLORES, S.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÉVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. **Plant and Soil**, v.108, p.179-184, 1988.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO J NIOR, W. Q. VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 49- 58, 1998.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTRHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. (eds.) **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1988, p. 293-303.

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.

MULDER, N. J.; APWEILER, R.; ATTWOOD, T. K. et al. The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 315-318, 2003.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in Gram- negative bacteria. **Proteins: structure, function, and genetics**, v. 11, p. 95-110, 1991.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). BLAST. Disponível em <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>. Acesso em setembro de 2006.

NIEHAUS, K.; KAPP, D.; PÜHLER, A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. **Planta**, v. 190, p. 415-425, 1993.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V. et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 4136-4141, 2001.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M. L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKO, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 1210-1220, 1999.

PARKE, D. Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 3808-3817, 1995.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 64, p. 180-201, 2000.

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry** (aceito, 12/2006).

SAFE, S. H. Polychlorinated-biphenyls (PCBs) - environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. **Critical Review of Toxicology**, v. 24, p.87- 149, 1994.

SAIER, M. H.; TAM, R. REIZER, A.; REIZER, J. Two novel family of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 841-847, 1994.

SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.426-433, 1991.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÈNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SIMPSON A. J. G.; REINACH, F. C. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

STOCCO, P. **Biodiversidade de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em regiões produtoras do Estado de Santa Catarina**. 2006. 56f. Tese (Mestrado em Ciência do Solo) e Departamento de Ciência do Solo, Universidade Estadual de Lages, Lages, 2006.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; RUMJANEK, N. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais de Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 3-11, 1999.

SUZUKI, K.; IWATA, K.; YOSHIDA, K. Genome analysis of *Agrobacterium tumefaciens*: construction of physical maps for linear and circular chromosomal DNAs, determination of copy number ratio and mapping of chromosomal virulence genes. **DNA Research**, v. 8, p. 141-152, 2001.

TATUSOV, R.; GALPERIN, M.; NATALE, D.; KOONIN, E. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 33-36, 2000.

VASCONCELOS, A. T. R.; ALMEIDA, D. F. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 9883-9888, 2003.

VINCENT, J. M. Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. Blackwell Scientific, Oxford, 1970, p.164. (IBP Handbook, 15).

VIPREY, V.; DEL GRECO, A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. K.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v. 1, p. 1-17, 2000.

WAELEKENS, F.; VOETS, T.; VLASSAK, J.; VANDERLEYDEN, J.; van RHIJIN, P. The nods gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and *Leucaena leucocephala*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 147-154, 1995.

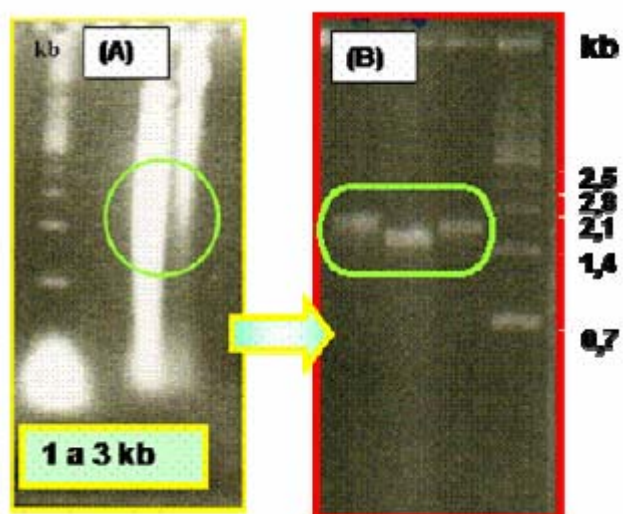
WOOD, D. W.; SETUBAL, J. C. et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, p. 2317-2323, 2001.

WU, C. H.; APWEILER, R.; BAIROCH, A.; NATALE, D. A.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; MAZUMDER, R.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; SUZEK, B. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p.187-191, 2006.

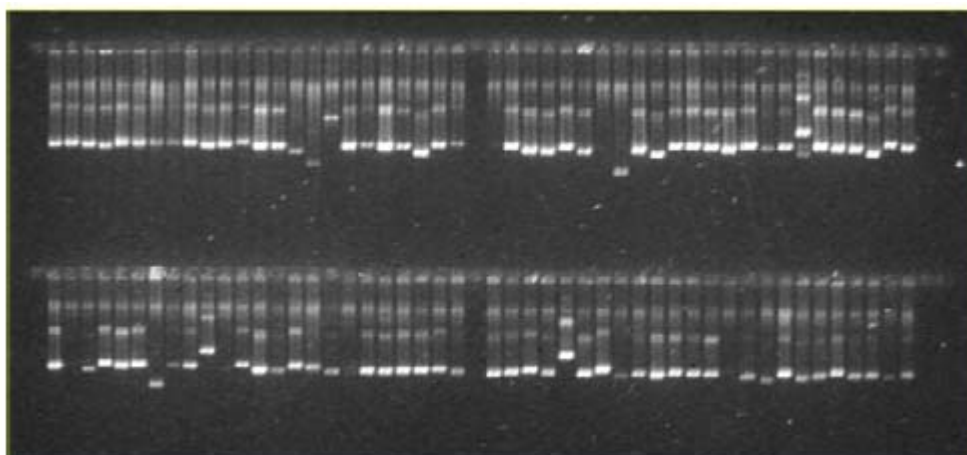
YIP, C. K.; KIMBROUGH, T. G. et al. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. **Nature**, v. 435, p.702-707. 2005.

YOUNG, J. P.; CROSSMAN, L. C. et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genomy Biology**, v. 7, R34.1- 20, 2006.

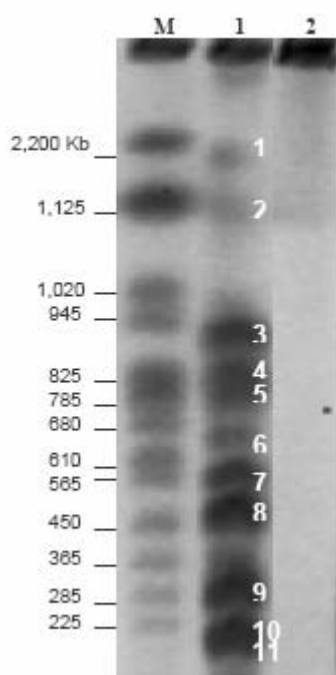
ZHU, J.; OGER, P. M.; SCHRAMMEIJER, B.; HOOYKAAS, P. J.; FARRAND, S. K., WINANS, S. C. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3885-3895. 2000.



**Figura 1** – (A) DNA após a nebulização por meio físico e (B) purificação dos fragmentos obtidos para a inserção no vetor.



**Figura 2** – Exemplo do DNA plasmidial extraído (“mini-prep”) dos clones de uma placa.



**Figura 3** – Fragmentos obtidos na análise de eletroforese de campo pulsado (PFGE) do DNA genômico da estirpe PRF 81. (M) marcador molecular *Saccharomyces cerevisiae*; (1) Digestão com a enzima de restrição *SwaI*; (2) DNA sem digerir.

**Tabela 1** – Número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão do DNA genômico da estirpe PRF 81 de *R. tropici* pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE, “pulsed field gel electrophoresis”) com a enzima *SwaI*.

Fragmento	Peso molecular (kb)
1	2.084
2	1.525
3	928
4	838
5	7667
6	560
7	504
8	324
9	222
10	112
11	91

Parâmetros	RTXX01	RTXX02	RTXX03	RTXX05	RTXX06	RTXX07	RTXX09	RTXX11
Número de leituras	87	244	899	177	532	641	5.044	1.402
Número de leituras sem vetor	52	108	712	110	417	498	4.317	1.193
Número de "contigs"	2	7	103	5	11	54	1.142	368
Número de "contigs" com duas leituras	1	4	79	4	10	35	605	282
Número de "singleton" isolados	43 (49,43% das leituras)	140 ( 57,38% das leituras)	562 ( 62,51% das leituras)	166 ( 93,79 % das leituras)	328 ( 61,65 % das leituras)	521 ( 81,28 % das leituras)	1.352 ( 26,80 % das leituras)	530 ( 37,80 % das leituras)
Número de bases depositadas (pares de bases, pb) (excluindo vetor, incluindo bases de baixa qualidade)	102.662	302.319	945.830	170.028	626.398	816.565	5.708.337	1.374.264
Número de bases de qualidade $\geq 20$ e % em relação às bases depositadas	16.408 (15,75%)	42.562 (13,28%)	110.576 (11,31%)	4.241 (2,44 %)	12.423 (1,95 %)	77.216 ( 9,33 %)	2.174.920 ( 36,70 %)	572.974 ( 39,43 %)
Número de bases do vetor e % em relação às bases depositadas	1.515 (1,45%)	18.176 (5,67%)	32.037 (3,28%)	3.698 (2,13 %)	9.659 (1,52 %)	10.933 (1,32 %)	217.582 (3,67 %)	78.697 (5,42 %)
Número de leituras "g" + "b"	0	67	422	0	88	272	2.090	656
Número somente de "b"	0	97	30	0	185	89	345	33
Número somente de "g"	87	13	25	177	81	8	346	57

**Quadro1** – Parâmetros analisados no seqüenciamento das bibliotecas da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*.

Parâmetro	Resultado
Tamanho estimado do genoma (pb)	7.850.000
Número total de leituras	9.026
Número total de leituras sem vetores (<=10% vetor)	8.431
Nº de bases depositadas (pb)	10.046.403 (100%)
excluindo vetor, incluindo bases de baixa qualidade	
Cobertura do genoma com as bases depositadas	1,28 vezes (128%)
Número de bases com qualidade >=20 (pb) (% do total de bases depositadas)	4.526.803 (45,06%)
Cobertura do genoma com as bases >=20	57,67%
Número de bases com qualidade >=30 (pb) (% do total de bases depositadas)	3.629.712 (36,13%)
Cobertura do genoma com as bases >=30	46,24%
Tamanho médio das leituras com qualidade >=20 (pb)	501
Número total de "contigs"	2.789
Tamanho médio dos "contigs" (pb)	1.303,99
Cobertura por "contigs" phrap (pb)	2.097.134
Número médio de leituras em um "contig"	3,24
Qualidade média das bases nos "contigs" (phrap)	23,04
Cobertura do genoma, considerando-se a soma dos "contigs" (pb) e em %	2.175.048 (27,71%)

**Quadro 2** – Parâmetros relativos ao panorama genômico obtido para a estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*.

**Tabela 2** – Distribuição das CDSs da estirpe PRF 81 de *R. tropici* em categorias do COG, em comparação com as demais espécies seqüenciadas de rizóbios.

	<i>B. japonicum</i> USDA 110	<i>M. loti</i> MAFF303099	<i>M. loti</i> BNC1	<i>R. etli</i> CFN 42	<i>R.</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	<i>S. meliloti</i> 1021	<i>R. tropici</i> ** PRF 81 (SEMIA 4080)
<b>Proteínas no cromossomo</b>							
Classificadas no COG	5362	4580	-	2859	-	3341	1612
Não Classificadas no COG	2955	2163	-	1176	-	2490	580
Não Analizadas no COG	-	-	4064		4699	-	-
<b>Nº Total de Proteínas no cromossomo</b>	<b>8317</b>	<b>6743</b>	<b>4064</b>	<b>4035</b>	<b>4699</b>	<b>5831</b>	<b>2192</b>
<b>Classificação</b>	<b>Categoria/Descrição</b>						
	A, Processamento e modificação de RNA	0	0	-	0	-	0
	B, Estrutura dinâmica da cromatina	0	0	-	0	-	0
	C, Produção e conversão de energia	<u>457</u>	<u>300</u>	-	<u>182</u>	-	<u>163</u>
	D, Controle do ciclo celular	<u>34</u>	<u>29</u>	-	<u>24</u>	-	<u>25</u>
	E, Transporte e metabolismo de aminoácidos	<u>710</u>	<u>644</u>	-	<u>320</u>	-	<u>332</u>
	F, Transporte e metabolismo de nucleotídeos	<u>83</u>	<u>81</u>	-	<u>79</u>	-	<u>71</u>
	G, Transporte e metabolismo de carboidratos	<u>327</u>	<u>449</u>	-	<u>270</u>	-	<u>192</u>
	H, Metabolismo de Coenzimas	<u>185</u>	<u>171</u>	-	<u>100</u>	-	<u>104</u>
	I, Transporte e Metabolismo de lipídios	<u>395</u>	<u>268</u>	-	<u>132</u>	-	<u>117</u>
	J, Tradução, estrutura e biogênese ribossomal	<u>162</u>	<u>161</u>	-	<u>143</u>	-	<u>140</u>
	K, Transcrição	<u>459</u>	<u>495</u>	-	<u>287</u>	-	<u>222</u>
	L, Replicação, recombinação e reparo do DNA	<u>286</u>	<u>240</u>	-	<u>132</u>	-	<u>167</u>
	M, Parede celular e biogênese da membrana	<u>309</u>	<u>285</u>	-	<u>222</u>	-	<u>133</u>
	N, Motilidade e secreção celular	<u>137</u>	<u>48</u>	-	<u>66</u>	-	<u>49</u>
	O, Modificações pós-traducionais, "turnover" protéico, proteínas "chaperones"	<u>221</u>	<u>174</u>	-	<u>126</u>	-	<u>115</u>
	P, Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	<u>323</u>	<u>237</u>	-	<u>144</u>	-	<u>137</u>
	Q, Biosíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários	<u>300</u>	<u>204</u>	-	<u>94</u>	-	<u>77</u>

	R, Função geral descrita somente por predição	<u>809</u>	<u>709</u>	-	<u>403</u>	-	<u>369</u>	213
	S, Função desconhecida	<u>488</u>	<u>431</u>	-	<u>273</u>	-	<u>233</u>	92
	T, Mecanismos de transdução	<u>385</u>	<u>189</u>	-	<u>180</u>	-	<u>101</u>	53
	U, Secreção e tráfego intracelular	<u>121</u>	<u>90</u>	-	<u>50</u>	-	<u>54</u>	27
	V, Mecanismo de defesa	<u>95</u>	<u>60</u>	-	<u>41</u>	-	<u>30</u>	33
	W, Estrutura extracelular	0	<u>1</u>	-	0	-	<u>1</u>	4
	Y, Estrutura nuclear	-	-	-	-	-	-	0
	Z, Citoesqueleto	<u>1</u>	0	-	0	-	0	0
<b>N° Total *</b>		<b>6287</b>	<b>5266</b>	-	<b>3268</b>	-	<b>2832</b>	<b>1612</b>
<b>Proteínas nos plasmídeos</b>								
plasmídeo	Não classificadas	-	320	317	175	156	1294	-
plasmídeo	Não classificadas	-	209	113	163	132	1570	-
plasmídeo	Não classificadas	-	-	49	232	305	-	-
plasmídeo	Não classificadas	-	-	-	336	442	-	-
plasmídeo	Não classificadas	-	-	-	455	634	-	-
plasmídeo	Não classificadas	-	-	-	567	781	-	-
<b>N° Total de proteínas no genoma</b>		<b>8317</b>	<b>7272</b>	<b>4543</b>	<b>5963</b>	<b>7151</b>	<b>6205</b>	<b>2192</b>
<b>RNAs</b>		<b>56</b>	<b>57</b>	<b>72</b>	<b>59</b>	<b>61</b>	<b>65</b>	<b>25</b>

\* O número é maior porque algumas proteínas são classificadas em duas categoria do COG.

\*\* Dados correspondentes ao sequenciamento parcial de 27,71 % do genoma.

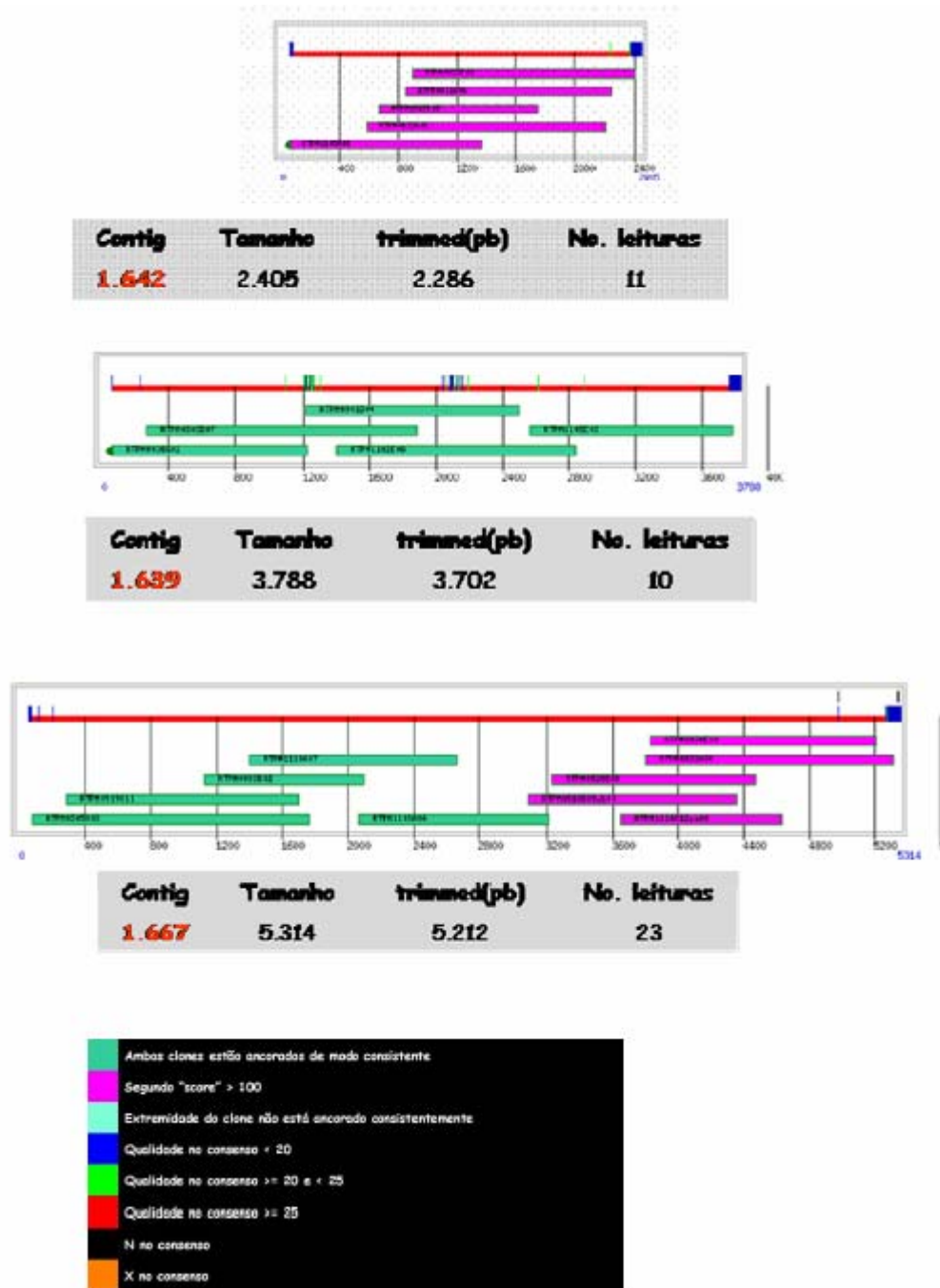
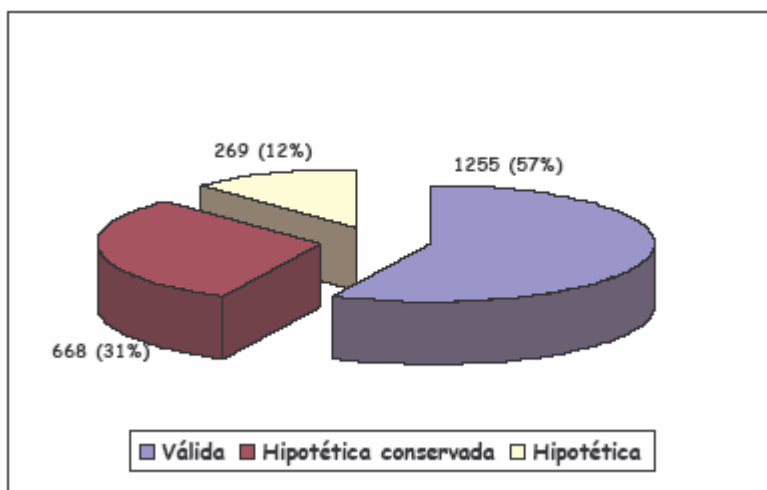
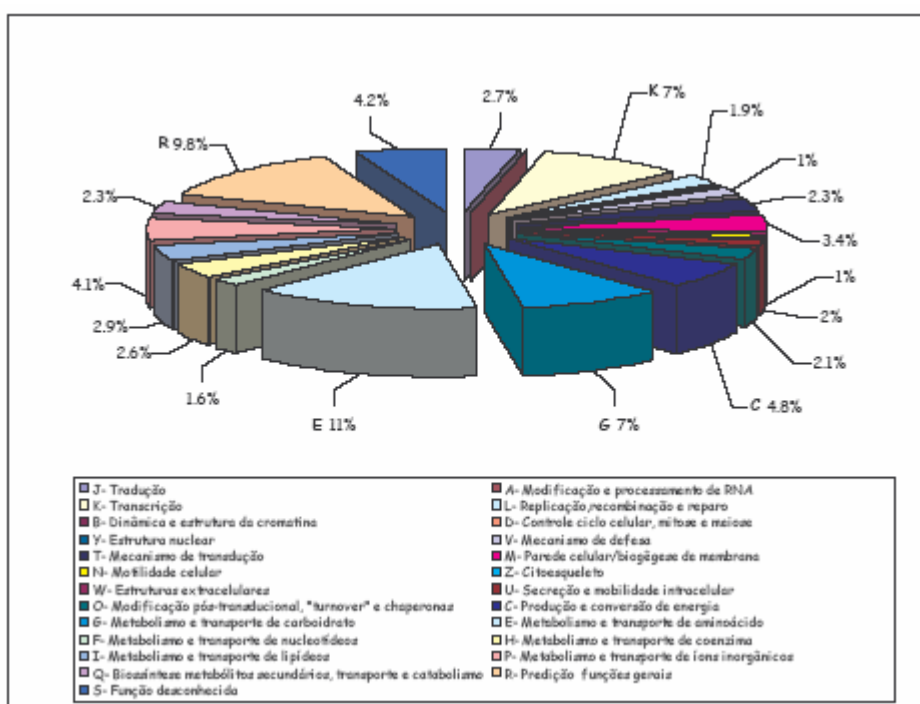


Figura 4 – Exemplo de alguns “contigs” formados com as seqüências da estirpe PRF 81



**Figura 5** – Classificação das CDSs da estirpe PRF 81 de *R. tropici*



**Figura 6** – Distribuição percentual das CDSs da estirpe PRF 81 de *R. tropici* segundo a base de dados COG.



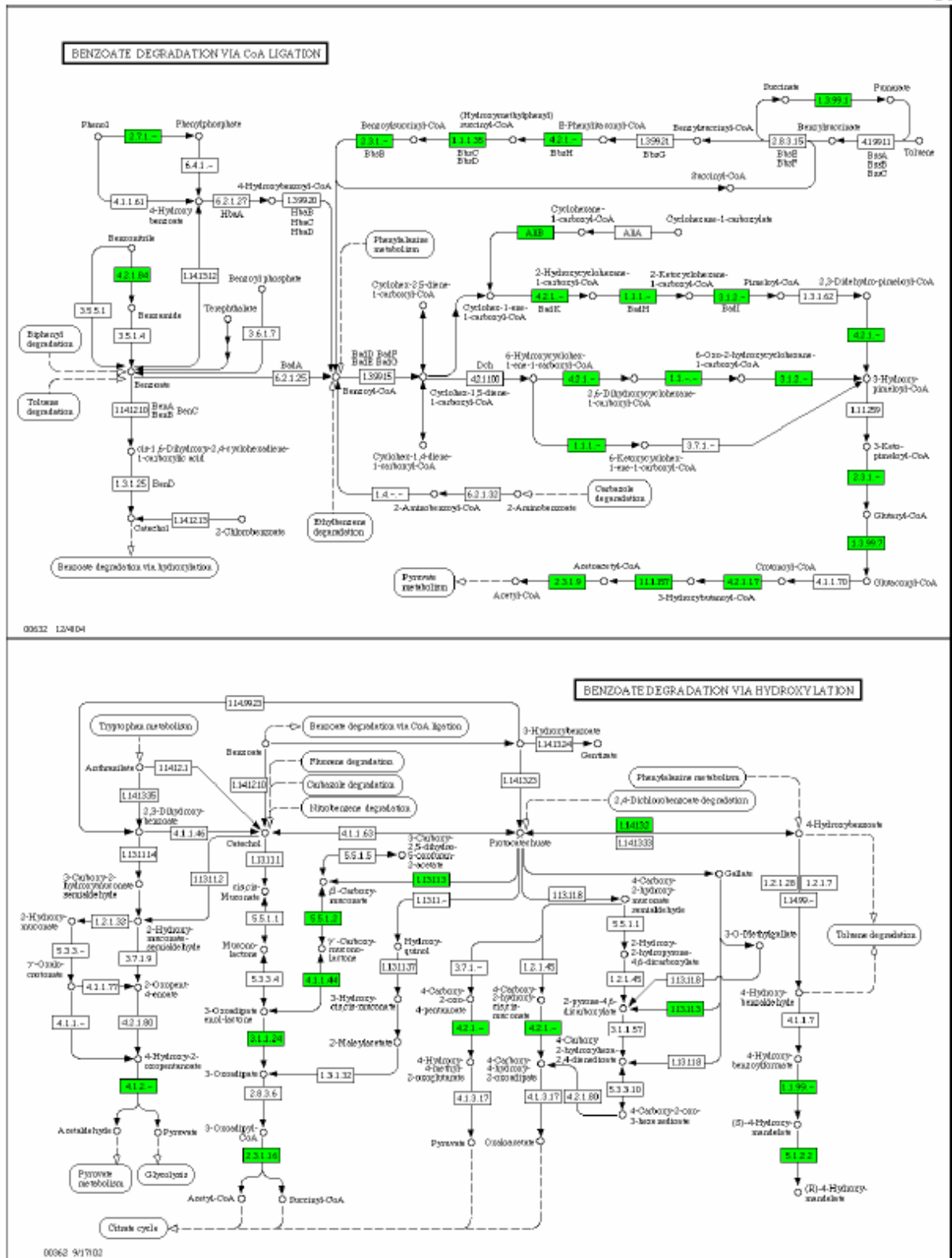
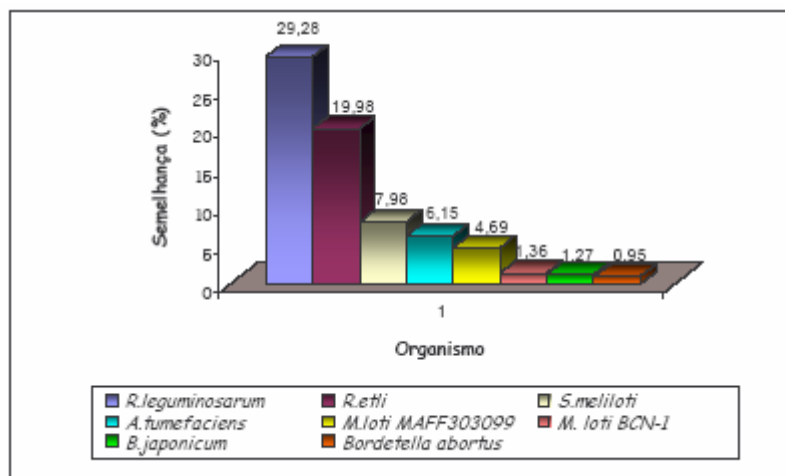
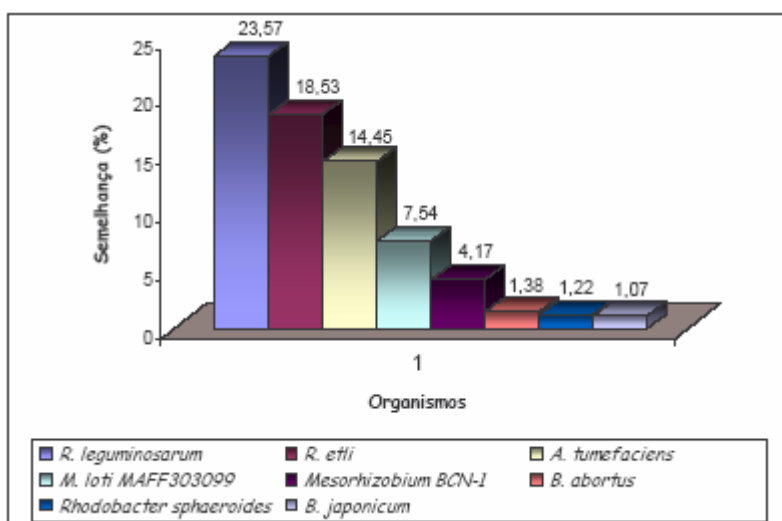


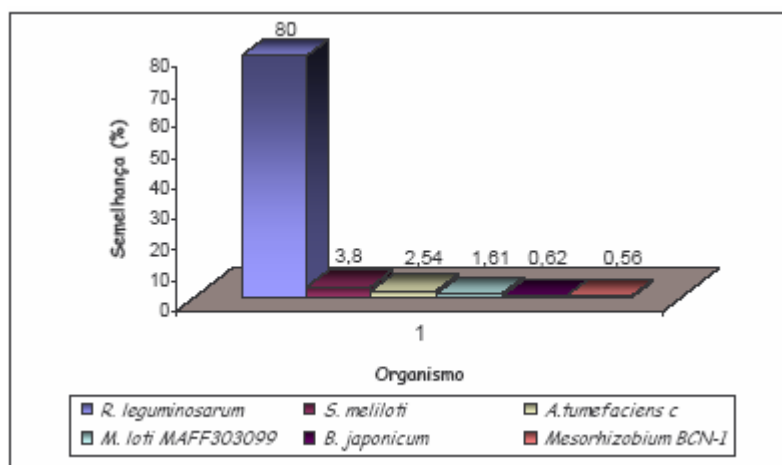
Figura 8 – Vias metabólicas de degradação do benzoato já identificadas em *R. tropici* estirpe PRF81.



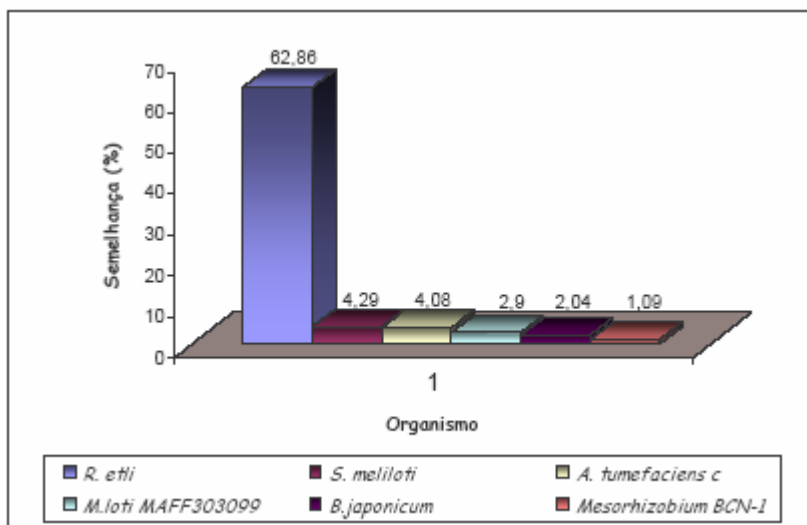
**Figura 9** – Semelhança percentual das CDSs de *R. tropici* PRF 81, segundo a base de dados KEGG, comparadas a outros organismos.



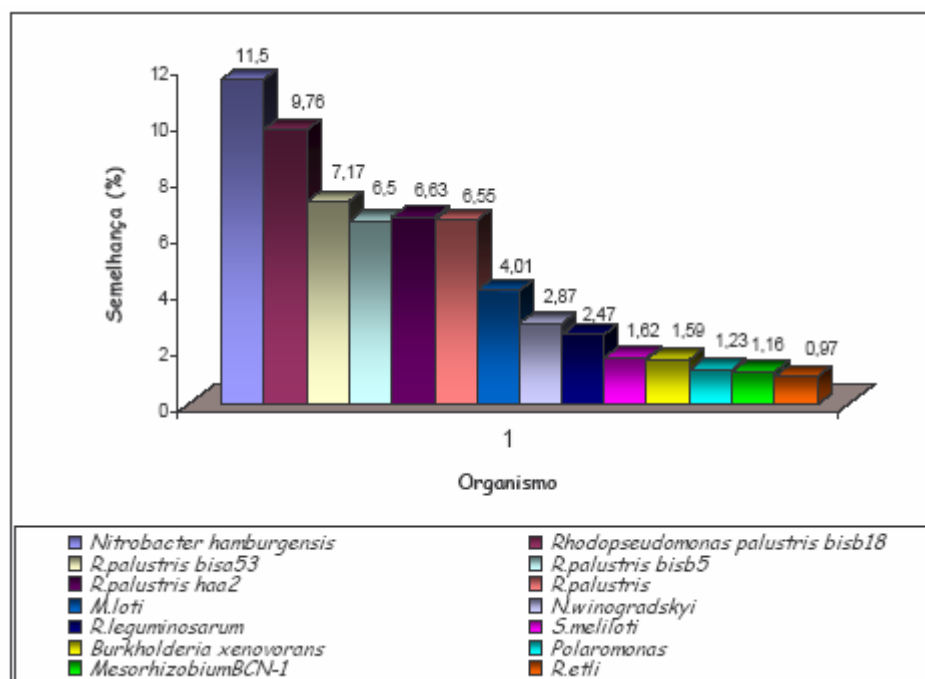
**Figura 10** – Semelhança percentual das CDSs de *Sinorhizobium meliloti*, segundo a base de dados KEGG, comparadas a outros organismos.



**Figura 11** – Semelhança percentual das CDSs de *Rhizobium etli* CFN 42, segundo a base de dados KEGG, comparadas a outros organismos.



**Figura 12** – Semelhança percentual das CDSs de *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae 3841, segundo a base de dados KEGG, comparadas a outros organismos.



**Figura 13** – Semelhança percentual das CDSs de *Bradyrhizobium japonicum*, segundo a base de dados KEGG, comparadas a outros organismos.