

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA
NO GÊNERO *Rhizobium* POR MEIO DOS
MARCADORES MOLECULARES DE RAPD

Juliana Alves São Julião

Monografia apresentada
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para a
obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG.

Dezembro - 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA
NO GÊNERO *Rhizobium* POR MEIO DOS
MARCADORES MOLECULARES DE RAPD

Juliana Alves São Julião

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para a
obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG.

Dezembro - 1997

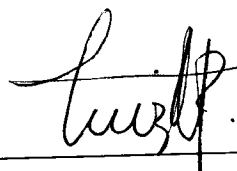
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DETERMINAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA NO
GÊNERO *Rhizobium* POR MEIO DOS MARCADORES
MOLECULARES DE RAPD**

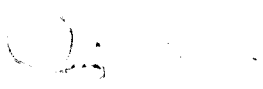
Juliana Alves São Julião

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 11 / 12 / 97

Nota 100,0



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho


Prof. Dr. Vicente Militão Neto
Msc. Gismar Silva Vieira

Uberlândia, 11 de dezembro de 1997

DEDICATÓRIA

*À aquela que vive lutando e me
ensinou a lutar, incentivando
para essa busca, dedico com
todo carinho...*

À MINHA MÃE

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Suprema Personalidade de Deus pelo meu referencial de conhecimento, veracidade, equanimidade, benevolência e bem-aventura.

Agradeço a você Prof. Luiz Ricardo, por seus exemplos, tendências e habilidades profissionais, dedicação à ciência e oportunidade de realização desse trabalho sob sua orientação.

A meus irmãos Silvana, Adriana, Marcelo e Viviana, pelo reconhecimento e compreensão de minha ausência para vencer mais uma jornada.

À minha querida tia Silvia, que me ajudou a cumprir mais uma missão desta vida, cujo sonho está se realizando.

Um enorme abraço à você Wânia, minha amiga especial, pelos momentos de luta que juntas passamos em casa e na sala de aula, e por seus ensinamentos no meu processo de aprendizagem da vida.

Ao grande amigo Kleber, pelas opiniões, sugestões e incentivo para realizar mais uma etapa da vida.

Com muita humildade, reconhecimento e gratidão que agradeço a todos os meus amigos do laboratório, que por suas experiências e incentivo pude aprender muito do que não sabia; Gismar, Juarez, Terezinha, Marta, Warlei, Christiane, Cristina, Maurício Machain, Viviam, Maurício Borges, Miriam, Marcelo, Graciele, Bárbara, Soraya, Rosana, Ana Paula, Vicente, Leonardo, Waldesse, Alessandra, Adelmo, Eduardo, Gisele, Keilah, Alba, Sônia.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	9
Obtenção das Estirpes	9
Crescimento Celular	10
Isolamento do DNA	10
Amplificação do DNA via PCR	12
Eletroforese e Coloração	13
Análise dos Dados	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	23

RESUMO

A análise do genoma bacteriano tem despertado o interesse na sistemática e taxonomia, deduzindo as relações evolutivas dentro do grupo dos microorganismos. Estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio do ar, *Rhizobium*, têm relatado a divergência genética nesse gênero através da hibridação DNA-DNA ou DNA-RNA, enzimas metabólicas, RFLP, entre outras. Porém, nosso trabalho foi utilizar a técnica RAPD para discriminar a nível molecular as espécies e estirpes de *Rhizobium* e determinar a distância genética entre as espécies e estirpes por meio dos marcadores moleculares RAPD. As espécies e estirpes utilizadas foram *R. tropici* (CFN 299, F 98-5 e CIAT 899) e *R. etli* (CFN 42 e CNPAF 146), as quais foram incubadas em meio líquido 79 para posterior isolamento do DNA. Vinte e um primers foram testados quanto a amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase. Os produtos amplificados foram separados em eletroforese de agarose (1.4%), corados por brometo de etídio e visualizados em UV. Desses, somente 11 apresentaram um perfil eletroforético, gerando 121 bandas das quais 5 foram monomórficas. Cada locus amplificado foi referido de acordo com a presença (1) ou ausência (0) dos locus resultantes, podendo assim montar a matriz binária. A partir dessa matriz foi possível estimar a matriz das distâncias entre as estirpes através do modelo do Percentual de Desacordo, revelando uma diferença de 40% entre as estirpes CIAT 899 e CFN 299 e a maior dissimilaridade de 56% entre as estirpes CNPAF 146 e CFN42. Análise de cluster foi feita pelo método UPGMA e a divergência genética foi obtida pelo percentual de desacordo na matriz de dissimilaridades gerada. As estirpes CFN 299 e CIAT 899 apresentaram a menor divergência genética de 40%; F 98-5 em relação a esse cluster apresentou uma distância de aproximadamente 47%, seguido de CFN 42 e CNPAF 146, com 49% e 51%, respectivamente. Os resultados apontaram alguns possíveis marcadores moleculares, tanto para a espécie *R. tropici* quanto *R. etli*, os quais devem ser avaliados para poderem representar uma melhor opção de seleção para estirpes tolerantes a altas temperaturas. Nossos estudos demonstraram que marcadores moleculares de RAPD podem ser úteis para estudos filogenéticos no gênero *Rhizobium*.

INTRODUÇÃO

O estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio do ar tem sido de grande interesse para a agricultura há mais de um século. Nos últimos anos, tornou-se ainda mais interessante, por ser uma forma barata de conseguir compostos químicos nitrogenados de grande importância biológica e econômica, e por representar um significativo parâmetro no aprimoramento de projetos de desenvolvimento autosustentável. Isso permite resolver parte dos graves problemas ecológicos decorrentes do uso abusivo de fertilizantes nitrogenados, além de ser essencial para a preservação da biodiversidade.

Aplicações de calcário e adubo em solos ácidos corrigem a toxicidade e suprem de elementos deficientes. Entretanto, a adubação em muitas áreas não é sempre economicamente

possível devido ao alto preço e custo no transporte. Por essa razão, o desenvolvimento de sistemas adaptados envolvendo estirpes de *Rhizobium* tolerantes a acidez e alumínio, e plantas tolerantes ao pH ácido e adaptadas a baixa fertilidade do solo, é uma estratégia de grande benefício (Bordeleau, 1994).

A análise do genoma bacteriano tem despertado o interesse de vários sistematas e taxonomistas, visando identificar unidades sistemáticas baseadas em similaridades filogenéticas, deduzir as relações evolutivas entre essas unidades, através dos dados moleculares. Esses dados não tem revelado apenas o parentesco entre espécies de bactérias, mas também demonstrado a existência da diversidade de marcadores genéticos dentro do grupo de microorganismos (Martinez-Romero, 1994).

Estudos têm revelado uma importante introspecção dentro dos aspectos moleculares da interação planta/hospedeiro. Essa relação foi mais intimamente acompanhada após a descoberta de genes das linhagens de *Rhizobium* e suas funções, distribuídos no cromossomo e em um ou mais plasmídios. Um desses plasmídios, chamado de plasmídio *sym*, contém vários genes de importância para a interação simbiótica. Entre esses genes estão os genes *nif*, que se relacionam com o sistema de fixação de nitrogênio e regulação de sua síntese (Kaluzá *et al.*, 1983); os genes *fix*, que codificam para diferentes funções com

papel específico de suportar a fixação de nitrogênio, e finalmente os genes *nod*, que desempenham um papel durante a infecção e nodulação (Quispel, 1988).

As modernas técnicas que possibilitam classificar bactérias que nodulam raízes, têm conduzido ao reconhecimento de novas espécies e gêneros. Dentro do gênero *Rhizobium* estão incluídas as espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. fredii*, *R. galegae*, *R. tropici*, *R. huakuii* e *R. etli*.

O *R. tropici* nativo da América do Sul e Central foi encontrado também em solos ácidos do Quênia. Ele possui uma única cópia do gene *nif* no plasmídio, e apresenta uma capacidade de fixar quantidades maiores de nitrogênio em altas temperaturas, e maior estabilidade simbiótica, nodula *Phaseolus vulgaris* (Feijão) e *Leucaena* spp (Martinez et al., 1993). Segovia et al. (1993) sugeriu que linhagens de *R. etli* foram introduzidas na Europa juntamente com o feijão, possuindo múltiplas cópias do gene *nif* no plasmídio, e tendo várias mudanças restritas para nodulação, mas nodulando somente *P. vulgaris*. Esta espécie foi criada recentemente para reclassificar a *R. leguminosarum* bv *phaseoli*. Ambas espécies são de origem americana, mas exclusivamente de áreas tropicais.

Os métodos mais utilizados para estudos em taxonomia e sistemática de bactérias são discutidos por Schleifer & Stackebrandt (1983), Selander et al. (1986), Graham et al.

(1991): análise polimórfica de hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA, variação das seqüências do rRNA 16S, DNA repetitivo (REP-PCR), análises eletroforéticas de enzimas metabólicas e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Um dos avanços para estudos de biodiversidade apareceu com o advento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo também o seu princípio útil para a derivação de outras técnicas de grande utilidade (Schierwater, 1995). Essa técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de uma infinidade de cópias de um segmento do DNA, pela ação da enzima DNA polimerase. A reação se processa em ciclos compreendidos de uma fase de desnaturação, uma de anelamento e outra de extensão. Primeiramente, a fita dupla de DNA alvo é separada através da elevação da temperatura (92 a 95 °C). Em seguida, ocorre uma redução dessa temperatura (35 a 60 °C) a fim de que pequenas moléculas de DNA de fita simples denominadas *primers*, que são complementares as seqüências que flanqueiam a região alvo, hibridizem-se com as fitas do DNA molde. Na próxima etapa, a temperatura é elevada a 72 °C para que a enzima *Taq* DNA polimerase realize a síntese de um segmento que tem início na extremidade 3' de cada *primer*, e que envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo. Essas etapas se repetem várias vezes, de

modo que o número de cópias dobra ao final de cada ciclo, aumentando em progressão geométrica .

Uma nova técnica derivada da PCR, surgiu a partir de dois grupos independentes (Williams et al, 1990; McClelland, 1990), que utilizando *primers* curtos e de sequência arbitrária, dispensaram o conhecimento prévio das sequências que flanqueavam o fragmento alvo. A técnica ficou conhecida como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), onde fragmentos de DNA do genoma são amplificados pelo uso de um único *primer* de sequência nucleotídica arbitrária. Vários fragmentos são amplificados quando esse *primer* encontra sequências complementares ao longo do genoma, anelando-se às fitas semiconservativas do DNA template. Quando um grupo de indivíduos ou classes taxonômicas são analisadas, os produtos monomórficos ou polimórficos dessas ampliações, dependendo do caso, correspondem a marcadores moleculares RAPD.

Hadrys *et al.* (1992) sugeriu uma nova técnica para discutir questões em sistemática e filogenética, a Amplificação Arbitrária do DNA (AAD). Essa técnica independe de alguma informação prévia sobre o genoma, utiliza pequenas quantidades de DNA, e produzem marcadores altamente efetivos em termos de custo e exigência de tempo. Esses

marcadores têm surgido como uma poderosa ferramenta para a análise de parentesco e diversidade genética.

Uma característica fundamental desses marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes, ou seja, são amplificadas seqüências de indivíduos tanto homozigotos quanto heterozigotos, e o polimorfismo é reconhecido como a presença de um fragmento específico amplificado em um genótipo, mas não em outro. Isso pode ser resultado de deleções que alteram o sítio de ligação do *primer* impedindo uma associação com o DNA molde, ou de inserções que mudam o tamanho do segmento a ser amplificado. Isso proporciona a produção de fragmentos de tamanho diferenciado, gerando um polimorfismo (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). A alteração de uma única base no genoma também pode prevenir a amplificação.

Facilidade, simplicidade, necessidade de pequenas quantidades de DNA para análise, rapidez em gerar altos números de marcadores, aplicações em estudos de qualquer espécie, e facilidade em detectar polimorfismos sem requerer conhecimento da seqüência genômica, são algumas das vantagens que essa técnica fornece para a análise de variabilidade genética em relação aos demais métodos (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Caetano-Anollés, 1991; Hu & Quiros, 1991; Schierwater, 1995).

A principal desvantagem da técnica é que os padrões gerados são bastante sensíveis às condições de reação, podendo levar a uma baixa reprodução dos resultados da amplificação (Weeden et al, 1992). Vários fatores como concentração de magnésio, temperatura de anelamento do *primer*, tamanho e composição das bases do *primer* (Ellsworth et al, 1993), qualidade do DNA molde (Weeden et al, 1992), concentração do DNA molde e do *primer* (Kernodle et al, 1993), e até mesmo os termocicladores (Meunier & Grimont, 1993) e marcas de DNA polimerases (Schierwater & Ender, 1993), afetam a amplificação, devendo ser devidamente controlados através de otimização.

Mesmo assim, a técnica do RAPD vem sendo utilizada com grande sucesso em vários estudos genéticos, como: identificação de híbridos, mapeamento genético, identificação de cultivares, geração de *fingerprinting*, variabilidade genética desde populações até gêneros, entre outros.

Comparações dessa técnica com outras moleculares ou bioquímicas para avaliação da diversidade genética e estimativa de parentesco, permitem compreender os mecanismos que operam em evolução, produzindo resultados confiáveis e consistentes.

A ausência de trabalhos comparativos abordando as espécies *R. etli* e *R. tropici* por meio dos marcadores RAPD, permitiu-nos dirigir e formular os objetivos deste trabalho:

- (1) utilizar a técnica RAPD para discriminar a nível molecular espécies e estirpes de *Rhizobium* e
- (2) determinar a distância genética entre as espécies e estirpes por meio dos marcadores RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia (MG), durante o período de janeiro a novembro de 1997.

Obtenção das estirpes

As espécies e estirpes investigadas neste estudo foram: *R. tropici* (CFN-299, F-98.5 e CIAT-899) e *R. etli* (CFN-42 e CNPAF-146), as quais foram obtidas liofilizadas do Centro Nacional de

Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB-RJ) e armazenadas em placas de petri a 4°C, no Laboratório de Genética Molecular da UFU.

Crescimento Celular

As culturas que estavam crescidas em meio sólido, em placas de petri, foram utilizadas para inocular o meio líquido 79, cuja composição consiste das seguintes soluções concentradas a 10%: 1ml K_2HPO_4 , 4ml KH_2PO_4 , 2ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1ml NaCl, 400mg de extrato de levedura, 10g de sacarose e completadas para 1 litro de água. Após o meio ser esterilizado dentro de *Erlenmayer* devidamente lacrados, em autoclave, e após esfriados, as células bacterianas foram transferidas, em câmara de fluxo.

Isolamento do DNA

Após um crescimento celular de 48 horas a 32°C, numa incubadora com agitação a 180 opm (oscilações por minuto), o DNA foi extraído pela técnica do clorofórmio-álcool isoamílico. Essa técnica consiste em precipitar células bacterianas a 10.000 rpm por 10 minutos, adicionando posteriormente 0.5 ml de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 0.005M, Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.2M e proteinase K 100µl/ml) ao *pellet* formado, e

incubando a 50°C por 1 hora. Ao fim de agitações leves a cada 15 minutos, um choque térmico (em gelo) por 5 minutos é fornecido. Decorrido este tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria, e adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitando com suaves inversões por cerca de 5 minutos. Os microtubos foram balanceados e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, procedendo novamente a extração com clorofórmio-álcool isoamílico. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado (-20°C) ao sobrenadante obtido. Inversões suaves nos tubos foram realizadas até que os ácidos nucléicos se tornassem visíveis. O ácido nucléico foi deixado *overnight* a 4°C para aumentar a eficiência da precipitação. Cada tubo foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, e os *pellets* de DNA colocados para secar à temperatura ambiente. Em seguida, foram ressuspensos em 200µl de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8.0), EDTA 0.1mM] contendo RNase a uma concentração final de 10µg/ml e incubados por 30 minutos a 37°C.

As amostras de DNA foram diluídas em uma relação de 10:1000µl (amostra de DNA/ volume final), e lidas em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a um comprimento de onda de 280nm para proteínas, e 260nm para DNA. A quantificação foi realizada de acordo com a fórmula:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times f$$

onde, A_{260} é a absorvância em 260nm, e f o fator de diluição. Nesse caso, o valor de f para as amostras foi igual a 1000/10. As mesmas foram avaliadas quanto à relação DNA/proteína (A_{260}/A_{280}), cuja relação ótima está entre 1.6 a 2.0, e quanto à qualidade do DNA por perfil eletroforético. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a uma concentração de 0.8% {0.8 g de agarose, 100ml de tampão TBE 0.5X [Tris-borato 45mM, EDTA 1mM (pH8.0)], 2.0 μ l de brometo de etídio (10 mg)} em uma cuba Horizon 11-14 (Life Technologies) contendo tampão TBE 0.5X durante 1 hora, com voltagem constante de 100 volts.

Amplificação do DNA via Reação em Cadeia da Polimerase pela Técnica do RAPD

Um experimento preliminar para otimização da reação de amplificação foi montado utilizando o *primer* MAU A1 fornecido pela empresa GIBCOBRL, nas seguintes condições: quatro concentrações de MgCl_2 (1.5, 2.5, 3.5, 4.5mM) e sete concentrações de DNA (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 100ng/reação). Dois programas para amplificação em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) foram analisados: (1) 2 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 35°C) e extensão (2 min a 72 °C); seguido de 33 ciclos de desnaturação

(10 seg a 94 °C), anelamento (20 seg a 40 °C), extensão (2 min a 72 °C) e uma extensão final de 72 °C a 5 min; (2) desnaturação inicial de 94 °C a 3 min, 39 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 35 °C), extensão (2 min a 72 °C), e finalizando com 5 min a 72 °C.

Cada reação partiu de um volume final de 25µl, com os demais componentes: 1U *Taq* DNA polimerase (CENBIOT/UFRS), tampão de reação 1X (10mM KCl₂ e 15mM MgCl₂), 200µM de cada dNTP (dinucleotídeos trifosfato) e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciadores da reação (*primers*). O volume foi completado com água ultrapura NANOpure (Barnstead). A cada microtubo de reação foi acrescentado 15µl de óleo mineral para evitar a evaporação.

Dez *primers* curtos (10 bases) e dos 11 *primers* longos (22 e 25 bases) foram avaliados, para amplificar os DNAs das 5 estirpes de *Rhizobium*.

Eletroforese e Coloração

Aos tubos com produtos amplificados foram adicionados 5µl de tampão *Loading* (azul de bromofenol, xileno cianol) e 10µl de cada amostra foi corrido em gel de agarose numa

concentração de 1.4% à voltagem constante de 120 volts em tampão TBE 0.5%.

Os géis foram corados com brometo de etídio, sendo este adicionado ao gel ainda líquido, a uma concentração final de 0.5µg/ml de gel e visualizados em luz ultravioleta.

Análise dos Dados

Os produtos amplificados foram avaliados pela presença ou ausência de bandas, sendo que o índice "1" foi dado à presença, e o índice "0" para a ausência. Foram feitas análises de *cluster* a partir de uma matriz de distâncias gerada por Percentual de Desacordo, e pela lei de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages), através do programa *STATISTICA*. Essa análise transforma um grupo heterogêneo de dados, em grupos que evidenciam aspectos a divergência genética obtida pelo percentual de desacordo na matriz de dissimilaridades. O final do processo ocorre quando todas as unidades taxonômicas operacionais estiverem reunidas num só grupo, em um dendrograma.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Para realizar a amplificação do DNA genômico das estirpes, por marcadores RAPD, a quantificação em espectrofotômetro e posterior qualificação em gel de agarose (Figura 1) foram de extrema importância para a reprodução das bandas geradas pela PCR.

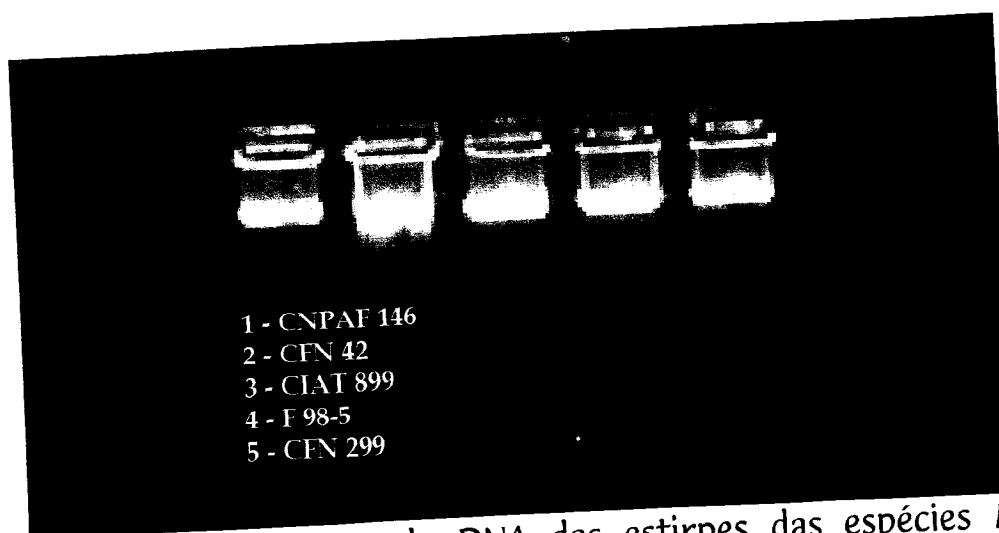


Figura 1. Isolamento do DNA das estirpes das espécies *R. tropici* e *R. etli*.

A estratégia usada para obter essa reprodução no perfil de bandeamento, envolvendo as diversas concentrações de DNAs

templates, $MgCl_2$, e condições nos ciclos da PCR, foram essenciais para não afetar a estringência da amplificação, devido a baixa complexidade do genoma.

As concentrações testadas que revelaram o melhor padrão de bandas consistentes foram: 40 ng de DNA e 2.5 mM de $MgCl_2$; concentrações acima de 50 ng não amplificaram, porém com 20 ng e 30 ng do *template* houve amplificação com menor intensidade. Essas análises também foram observadas por Caetano-Anollés *et al.* (1991), onde baixos níveis de *template* resultaram na geração de bandas inconsistentes, e ao passo em que se aumentava a concentração, o número de sítios alvos compensavam o efeito e evitavam a inconsistência do *fingerprint*.

Entre os 21 *primers* testados, apenas 10 produziram resultados informativos para as análises (Tabela 1). As amplificações com *primers* longos no programa (1) foram eficientes, enquanto que os *primers* curtos apresentaram um perfil eletroforético somente no programa (2), pois as temperaturas de anelamento foram diferentes. Essa temperatura afeta a formação, estabilidade e equilíbrio entre *primer* e *template*. *Primers* curtos requerem baixa temperatura de anelamento para se adequarem a amplificação, enquanto que os *primers* longos, exigem temperaturas um pouco mais elevadas.

Primers	Seqüências
A1	5'-CTTGGTGTACTACCCCTGGG-3'
MAU-201	5'-ATCCACACCCCCTCCACACAGT-3'
MAU-202	5'-CATTTTCCACCCTCCCCTACAG-3'
MAU-302	5'-CTGACAAAAGGTGGCGATTTCA-3'
MAU-402	5'-AATGTCACACTTGAATCGCATC-3'
MAU-601	5'-TGTGCTGGACACCGACTACAAAA-3'
MAU-901	5'-GAGGAAATACAGAACTCAGCCG-3'
OPA - 14	5' -TCTGTGCTGG- 3'
OPA - 18	5' -AGGTGACCGT- 3'
OPA - 19	5' -CAAACGTCGG- 3'

Tabela 1. Lista dos *primers* longos e curtos utilizados, com suas respectivas seqüências, que produziram informações para as estirpes de *Rhizobium*.

A análise dos *primers* revelou um total de 121 bandas, das quais 35 foram geradas por *primers* curtos e 86 por *primers* longos. Do total de bandas amplificadas 5 foram monomórficas, e 116 foram polimórficas correspondendo a 96% de polimorfismo entre as 5 estirpes analisadas (Figuras 2a, 2b e 2c).

Para cada *primer* analisado, um número variável de bandas ou *fingerprinting* foi observado. Cada *locus* amplificado foi referido de acordo com a presença (1) ou ausência (0) dos *locus* resultantes, podendo assim montar a matriz binária. Padrões cujas bandas ficaram duvidosas, não foram incluídas na análise.

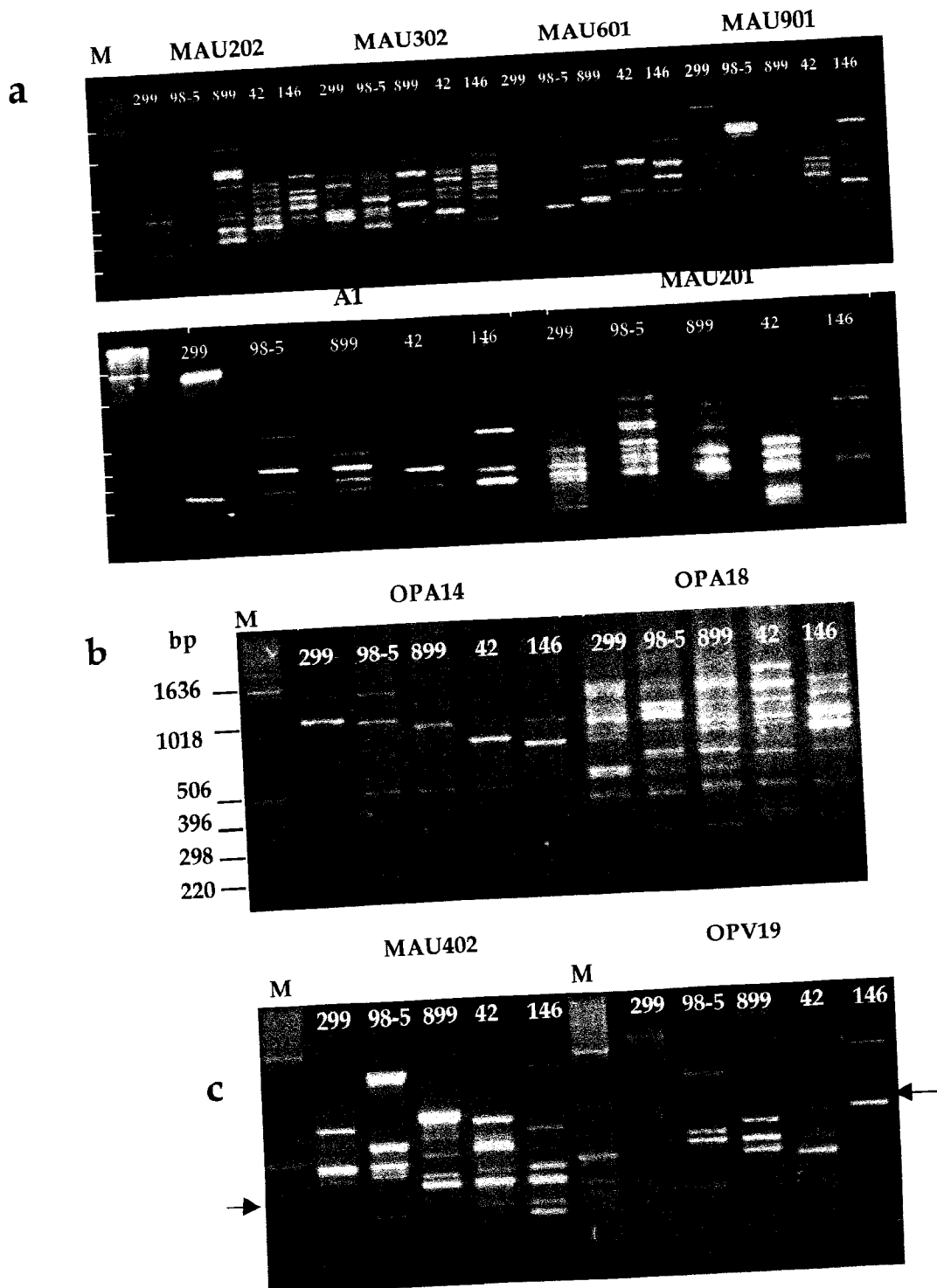


Figura 2. Perfis eletroforéticos das ampliações RAPD das cinco estirpes. a) Amplificações das amostras com primers longos; b) ampliações com primers curtos; c) primers longo e curto. M, marcador de peso molecular; 299, CFN299; 98-5, F 98-5; 899, CIAT899; 42, CFN42; 146, CNPAF146.

A partir da matriz binária foi possível estimar a matriz das distâncias entre as estirpes através do modelo do Percentual de Desacordo.

Essa matriz revelou uma diferença de 40% entre as estirpes CIAT 899 e CFN 299 correspondentes a *R. tropici* e a maior dissimilaridade, de 56%, verificada entre as duas estirpes CNPAF 146 e CFN 42 de *R. etli* (Tabela 3).

	CFN299	F 98-5	CIAT899	CFN42
F 98-5		.43		
CIAT 899		.40	.52	
CFN42		.45	.52	.50
CNPAF 146		.55	.50	.43
				.56

Tabela 3. Matriz das distâncias entre as estirpes, gerada a partir do modelo do Percentual de Desacordo.

Um dendrograma foi confeccionado utilizando o método UPGMA, baseado nos valores contidos na matriz das distâncias, para uma posterior análise de agrupamento entre os taxons. As estirpes CFN 299 e CIAT 899 apresentaram a menor divergência genética, correspondendo a 40%. Embora F 98-5 faça parte da mesma espécie que as anteriores, esta apresentou uma divergência maior em relação ao *cluster* formado pelas estirpes da sua espécie, aproximadamente 47%. Na espécie *R. etli*, a estirpe CFN-42 apresentou distância genética de 49% em relação

ao cluster formado pelas estirpes da espécie *R. tropici*. A estirpe CNPAF-146 está 51% distante do cluster formado pelas demais estirpes juntas (Figura 5).

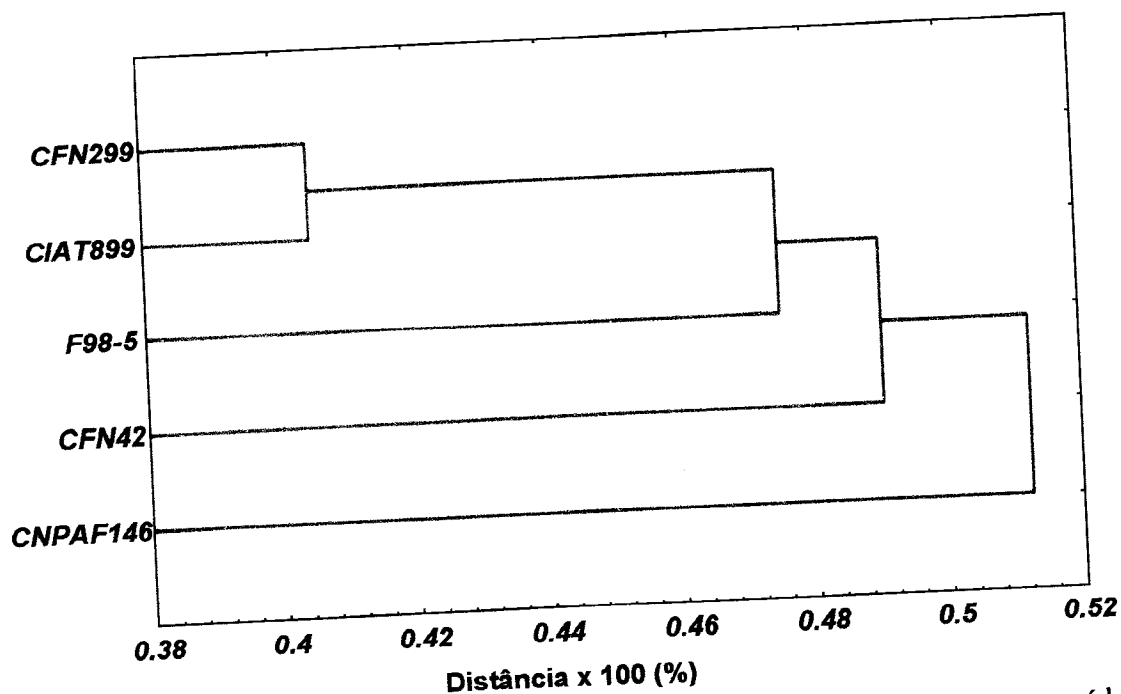


Figura 5. Dendrograma representativo da análise de cluster, construído a partir da matriz de distâncias pelo modelo de agrupamento UPGMA.

De acordo com os resultados, a técnica do RAPD agrupou as estirpes de forma concordante com a classificação estabelecida, baseada em características morfológicas, e sequências do rRNA 16S.

As ampliações também produziram bandas monomórficas para as estirpes da espécie *R. tropici*, que se comportaram como polimórficas para as estirpes da espécie *R. etli*. Houve também a ocorrência de bandas monomórficas para a espécie *R. etli*, que se comportaram como polimórficas em

relação as estirpes da espécie de *R. tropici*. O primer OPA18 produziu uma banda de aproximadamente 506 bp monomórfica para as três estirpes da espécie *R. tropici*, enquanto que o primers MAU402 e OPV19, geraram duas bandas monomórficas para as estirpes de *R. etli* de aproximadamente 340 e 800 bp, respectivamente. Essas bandas devem ser testadas com relação à capacidade das estirpes, dentro de cada espécie, de tolerar altas temperaturas. A importância desses testes seria a de encontrar algum marcador, por análise de *Linkage*, que estivesse bem próximo do gene de tolerância a temperaturas elevadas. A aplicação desses marcadores, contribuiria para aumentar a eficiência da seleção de estirpes mais adaptadas a solos de regiões com temperatura muito elevada.

CONCLUSÃO

Esses estudos demonstraram que marcadores moleculares de RAPD podem ser úteis para estudos filogenéticos no gênero *Rhizobium*. Na presente análise, os valores das distâncias genéticas obtidas e o dendrograma produzido, são informativos da relação de parentesco entre as espécies estudadas, podendo favorecer a seleção e caracterização de linhagens tolerantes a altas temperaturas, e capazes de manter suas características nessas condições. Essa seleção pode representar uma das alternativas para inoculação em culturas de solos tropicais.

Os resultados também apontaram possíveis marcadores moleculares, que devem ser avaliados para poderem representar uma melhor opção de seleção para estirpes tolerantes a altas temperaturas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BORDELEAU, L.M. & PRÉVOST, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* 161: 115-125.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology* 9: 553-557.
- ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE, K.D. & HONEYCUTT, R.L. (1993). Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14(2): 214-217.
- GRAHAM, P.H.; SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DELEY, J.; JARVIS, B.D.W.;

ROSLYCKY, E.B.; STRIJDON, B.W. & YOUNG, J.P.W. (1991).
Proposed minimal standards for the description of new
genera and species of root-and-stem nodulating bacteria.
Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 275-280.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; McCORD, S.;
WERNER, D.; AMERSON, H.; McKEAND, S.; BRIDGWATER, F.;
WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. & SEDEROFF, R. (1992).
Mapping in woody plants with RAPD markers: Application to
breeding in forestry and horticulture. Applications of RAPD
Technology to Plant Breeding. p. 37-40.

HADRYS, H.; BALICK, M. and SCHIERWATER, B. (1992).
Molecular Ecology. 1: 55-63.

HU, J & QUIROS, C.F. (1991). Identification of broccoli and
cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports
10: 505-511.

KALUZA, K.; FUHRMANN, M.; HAHN, M.; REGENSBERGER, B. &
HENNECKE, H.J. (1983). In *Rhizobium japonicum* the
nitrogenase genes *nif* H and *nif* DK are separated. J.
Bacteriol. 155: 915-918.

KERNODLE, S.P.; CANNON, E. & SCANDALIOS, J.G. (1993).
Concentration of primer and template qualitatively affects
products in random-amplified polymorphic DNA PCR.
BioTechniques 14(3): 362-364.

- MARTINEZ, E.; POUPOT, R.; PROMÉ, J.C.; PARDO, M.A.; SEGOVIA, L.; TRUCHET, G. & DÉNARIÉ, J. (1993). Chemical signaling of *Rhizobium* nodulation bean. In *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Eds. R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton. pp. 171-175, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- MARTNEZ-ROMERO, E. (1994). Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil* 161:11-20.
- MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373-379.
- QUISPEL, A. (1988). Bacteria-plant interactions in symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* 74: 783-790.
- SCHIERWATER, B. & ENDER, A. (1993). Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucl. Acids Res.* 21(19): 4647-4648.
- SCHIERWATER, B. (1995). Arbitrarily amplified DNA in systematics and phylogenetics. *Electrophoresis* 16: 1643-1647.
- SCHLEIFER, K. & STACKEBRANDT, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 143-187.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTINEZ-ROMERO, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum*

- biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 374-377.
- SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N. & WHITTAM, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.
- WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; HEMMAT, M.; KNEEN, B.E. & LODHI, M.A. (1992). Inheritance and reability of RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding.* p. 12-17.
- WELSH, J. and McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. AND TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.