

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

Diferenças genômicas entre a estirpe *Bradyrhizobium elkanii*  
SEMIA 587 e a estirpe de referência *B. japonicum* USDA 110

René Arderius Soares

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-graduação em Genética e  
Biologia Molecular da UFRGS  
como um dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre

Março de 2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Dedico este trabalho aos meus pais.*

## **Agradecimentos**

À professora Luciane Maria Pereira Passaglia, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Dra. Irene S. Schrank pela disposição em ajudar e ao Msc. Ricardo Cecagno, pelas discussões sobre este trabalho.

À minha família, por todo o apoio recebido.

À minha namorada Ana, uma pessoa muito especial.

A todos os colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola, Adriana Giongo, Adriana Ambrosini, Anelise Beneduzi, Pedro Beschoren da Costa e Samanta Campos.

A todos colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Em especial ao Gustavo, Japonês, João, Júlio, Lauro, Rafa, Beto, Marcelo, Alexandro e Diego

Ao CNPq, que financiou este trabalho.

## Sumário

Agradecimentos.....	4
Lista de Abreviaturas.....	6
Resumo.....	8
Abstract.....	10
1. Introdução.....	12
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos .....	18
Capítulo I.....	19
Capítulo II.....	43
4. Perspectivas.....	49
5. Considerações finais.....	50
6. Referências Bibliográficas .....	53

## Lista de Abreviaturas

AFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
DNA	ácido desoxirribonucleico
FBN	fixação biológica do nitrogênio
Kb	quilobase
kDa	quilodaltons
LM	levedura manitol
LB	Luria-Bertani
M	mol
Min	minuto
Mg	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\text{Mn}^{2+}$	íon manganês
NCBI-USA	Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos
N	nitrogênio
Ng	nanogramas
Pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
Pg	picogramas
Pmol	Picomole

RDA	análise de diferença representacional
rDNA	DNA ribossomal
rep-PCR	PCR de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos
RNA	ácido ribonucleico
Seg	segundo
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
TGH	transferência gênica horizontal
U	unidade
Vf	volume final

## Resumo

Rizóbios são bactérias estritamente aeróbias, quimioorganotróficas, com a forma de bastonetes não formadoras de esporos, Gram-negativas, com um tamanho que varia de 0,5-0,9  $\mu\text{m}$  X 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ . Normalmente encontradas no solo, fixam nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ) em simbiose com leguminosas e algumas plantas não leguminosas, induzindo a formação de nódulos nas raízes, permanecendo nestas como bacteróides fixadores de nitrogênio. No Brasil rizóbios são inoculados em lavouras de soja, pois a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio supre totalmente a necessidade de utilização de adubos nitrogenados. No presente estudo foi realizada uma análise comparativa entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe USDA 110) e *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 587) através da aplicação da técnica de RDA (*Representational Difference Analysis*). RDA é uma técnica bastante útil para revelar seqüências únicas entre dois genomas ou transcritomas semelhantes. Após três ciclos de hibridizações subtrativas e ampliações dos fragmentos *tester*, fragmentos de aproximadamente 300 pb foram gerados. Estes fragmentos foram clonados em pUC18 e seqüenciados. Das 200 seqüências obtidas, 46 pertenceram exclusivamente à *B. elkanii* e 154 tiveram homologia com *B. japonicum*. Entre as 46 seqüências sem homologia com *B. japonicum*, 39 não demonstraram homologia com nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados públicos e sete seqüências mostraram homologia com proteínas conhecidas. Estas sete seqüências foram divididas em três grupos: seqüências homólogas a outras estirpes ou espécies de *Bradyrhizobium*, seqüências homólogas a outras bactérias fixadoras de nitrogênio e seqüências homólogas a bactérias não fixadoras de nitrogênio. O grupo com homologia a estirpes de *Bradyrhizobium* foi composto por dois clones: clone i5 foi homólogo a um transportador ABC (*ATP Binding Cassette, hlyB like protein*) de *Bradyrhizobium* sp. ORS278, e o clone i29 foi homólogo à subunidade menor da carboxylase (tipo RuBisCO) da estirpe foto-organotrófica *Bradyrhizobium* sp. BTA1. O grupo com homologia a outras bactérias fixadoras de nitrogênio foi composto por três clones: clone i150 foi homólogo à subunidade alfa da 4-hydroxybenzoyl-CoA redutase de *Mesorhizobium loti*, clone i170 foi homólogo a uma proteína hipotética conservada de *Rhodopseudomonas palustris*, e o clone ii23 foi homólogo ao fator de virulência *mviN* de *Xanthobacter autotrophicus* Py2. O grupo com homologia a bactérias não fixadoras de nitrogênio foi também composto por



dois clones: clone i65 foi homólogo à peptidase M19 de *Sphingopyxis alaskensis* RB2256, e o clone i157 foi homólogo a uma proteína hipotética conservada de *Nitrobacter winogradsky*. Esse conhecimento genômico de *B. elkanii* poderá ajudar na compreensão das diferenças fisiológicas encontradas entre essas duas espécies e servir como base na caracterização de estirpes isoladas de nódulos de soja.

## Abstract

Rhizobia are strictly aerobic chemoorganotrophic rod-shaped sporeless bacteria. They are a Gram-negative bacteria with a size that varies between 0.5-0.9  $\mu\text{m}$  to 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . Normally found in the ground, they fix atmospheric nitrogen ( $\text{N}_2$ ) in symbiosis with leguminous plants and some non leguminous plants, inducing the formation of nodules in the roots where the bacterium differentiates itself into nitrogen-fixing bacteroids. In Brazil, rhizobia are inoculated in soybean crops. This inoculation totally fulfills the crop need of nitrogen. In the present study a comparative analysis was carried out between *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 110) and *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) through the application of the RDA technique (Representational Difference Analysis). RDA is a quite useful technique to reveal the unique sequences between two genomes or transcriptomes. After three cycles of subtractive hybridizations and amplifications of the tester DNA, 300 pb fragments were obtained. These fragments were cloned into pUC18 vector and were sequenced. Two hundred RDA sequences were obtained. Forty six sequences among the 200 belonged exclusively to the tester strain *B. elkanii* SEMIA 587, and 154 had homology to the driver strain *B. japonicum* USDA110. From the 46 sequences with no homology to *B. japonicum* USDA 110 genome, 39 showed no homology with sequences in public databases and seven sequences showed homology with known proteins. These seven sequences were divided in three groups: homolog to other *Bradyrhizobium* strains, homolog to other nitrogen-fixing bacteria, and homolog to non nitrogen-fixing bacteria. The group of homolog to other *Bradyrhizobium* strains was composed by two clones: clone i5 was homolog to a putative toxin secretion ABC transporter from *Bradyrhizobium* sp. ORS278, and clone i29 was homolog to a putative carboxylase like RuBisCO small subunit from the photoorganotroph *Bradyrhizobium* sp. BTA1. The group of homolog to other nitrogen-fixing bacteria was composed by three clones: clone i150 was homolog to a 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase alpha-subunit of *Mesorhizobium loti*, clone i170 was homolog to a conserved hypothetical protein of *Rhodopseudomonas palustris*, and clone ii23 was homolog to a virulence factor *mviN* of *Xanthobacter autotrophicus* Py2. The group of homolog to other non nitrogen-fixing bacteria was also composed by two clones: clone i65 was homolog to a peptidase M19 of *Sphingopyxis alaskensis* RB2256, and clone i157 was homolog to a conserved hypothetical

protein of *Nitrobacter winogradsky*. This better understanding of *B. elkanii* genome could help us in the comprehension of physiological differences between these two species and it could be a useful tool to characterize *Bradyrhizobia* strains isolated from soybean nodules.

## 1. Introdução

Rizóbios são bactérias estritamente aeróbias, quimioorganotróficas, com a forma de bastonetes não formadoras de esporos, Gram-negativas, com um tamanho que varia de 0,5-0,9  $\mu\text{m}$  X 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ . Sua mobilidade é dada por um flagelo polar único ou dois a seis flagelos peritríqueos (Somasegaram e Hoben, 1994). Normalmente encontradas no solo, fixam nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ) em simbiose com leguminosas e algumas plantas não leguminosas, induzindo a formação de nódulos nas raízes, permanecendo nestas como bacteróides fixadores de nitrogênio.

O nitrogênio (N), o quarto elemento mais importante nos organismos vivos, está presente em abundância na atmosfera terrestre sob a forma de  $\text{N}_2$ , na qual seus dois átomos estão ligados por uma ligação covalente tripla muito estável. Apesar da abundância e da aparente disponibilidade desta molécula para plantas e animais, estes não são capazes de transformar o nitrogênio atmosférico em alguma forma biologicamente útil. Para estes organismos, a fração de 78% de nitrogênio que compõe a atmosfera é inerte. Porém, existem alguns microrganismos, como bactérias e algas azuis, que são capazes de converter o nitrogênio atmosférico em formas que podem ser assimiladas por outros organismos, como a amônia. Estes microrganismos, chamados de diazotróficos, são responsáveis por aproximadamente 60% do nitrogênio fixado e disponível no ambiente. O processo de conversão do nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos assimiláveis recebe a denominação de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e o complexo enzimático responsável pelo processo de FBN é chamado de nitrogenase (Buchanan *et al.*, 2000).

A soja (*Glicine max* [L.] Merrill) é a principal leguminosa cultivada em nosso país, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial deste grão. No ano de 2008, a produção brasileira de soja foi de 60 milhões de toneladas, uma safra recorde no país, que ocupou 21,3 milhões de hectares (IBGE, 2008). Muito do sucesso do cultivo da soja no Brasil se deve à expansão da área utilizada para o cerrado brasileiro, a partir da década de 70. Essa área abrange cerca de 207 milhões de hectares, o que equivale a 25% da área terrestre brasileira. No início da expansão da cultura da soja no cerrado, os cultivos ali realizados apresentavam uma nodulação muito baixa ou inexistente e as plantas de soja possuíam uma coloração amarelada, característica de solos deficientes em nitrogênio. Esses resultados indicavam a ausência de estirpes de rizóbios eficazes no estabelecimento de uma simbiose

efetiva com a soja (Galli-Terasawa *et al.*, 2003).

Teoricamente, as fontes de N disponíveis para a cultura da soja são os fertilizantes nitrogenados e a FBN (Hungria *et al.*, 2001). Entretanto, em todo o país, a adubação nitrogenada não é recomendada para soja (Comissão de Química e Fertilidade do Solo, 2004), pois a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio supre totalmente a necessidade de utilização de adubos nitrogenados nas lavouras. Além da economia gerada pela inoculação com estirpes de rizóbios na soja, que se estima ser, no Brasil, de pelo menos R\$ 2,87 bilhões anualmente (Campo e Hungria, 2004; Menna *et al.*, 2006), a inoculação não origina poluição ambiental, consequência comum da utilização de fertilizantes nitrogenados. *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) e *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) são os rizóbios de multiplicação lenta associados a essa leguminosa. No entanto, no Brasil, apenas estirpes das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* são utilizadas comercialmente como inoculantes para a soja (Freire, 1977; Peres e Vidor, 1980; Alberton *et al.*, 2006).

Uma vez que a soja é uma cultura exótica, os solos brasileiros originalmente não possuíam rizóbios eficientes para essa leguminosa (Ferreira e Hungria, 2002; Hungria *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2006). Uma possibilidade bem aceita é que os atuais bradirrizóbios encontrados nos solos brasileiros possivelmente tenham vindo com as primeiras sementes de soja dos Estados Unidos. Com a inoculação massiva nas últimas décadas, essa população aumentou de forma significativa (Ferreira e Hungria, 2002). Em 1975, o governo brasileiro instituiu normas à produção e comercialização de inoculantes, definindo que os inoculantes utilizados nas lavouras do país deveriam conter apenas estirpes recomendadas por instituições públicas de pesquisa. A Coleção de Culturas de *Rhizobium* SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) é responsável, desde então, pela manutenção e distribuição das estirpes utilizadas comercialmente no país. A partir de 1992, apenas quatro estirpes são autorizadas para uso em inoculantes comerciais no Brasil: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (FEPAGRO, 1999).

Inicialmente, os rizóbios foram agrupados em um gênero único, *Rhizobium* Frank 1889 (Kuykendall *et al.*, 2005). Jordan (1982) sugeriu uma separação taxonômica baseada em curvas de crescimento, para diferenciar os rizóbios de multiplicação rápida (*Rhizobium*)

daqueles de multiplicação lenta (*Bradyrhizobium*). Esse último gênero era composto por apenas uma espécie, *B. japonicum*, isolada a partir de nódulos de raízes de soja. Embora o termo rizóbio tenha sido primeiramente utilizado para designar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, mais recentemente ele vem sendo usado para todas bactérias capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com leguminosas e/ou que pertençam a um gênero correlato (Willems, 2007).

Atualmente, os rizóbios estão distribuídos nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Azorhizobium* (Lafay e Burdon, 1998; Michiels *et al.*, 1998; Vásquez-Arroyo *et al.*, 1998; Perret *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002; Willems *et al.*, 2003) e *Allorhizobium* (Sessitsch *et al.*, 2002). A partir da década de 1980, o uso de ferramentas de genética molecular (hibridização DNA-DNA e seqüenciamento do rDNA), juntamente com técnicas moleculares mais modernas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) e seqüenciamentos genômicos, levaram à modificação e reorganização taxonômica dos gêneros existentes e à descrição de novos gêneros (Willems, 2007). Além dos gêneros citados acima, *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001), *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2003), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005) e *Cupriavidus* (Barret e Parker, 2006) possuem espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico em nódulos formados em raízes e em caules de plantas hospedeiras, podendo ser, também, denominados de rizóbios, como mencionado anteriormente (Willems, 2007).

Apesar das muitas características em comum existentes entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*, que já foram consideradas como uma só espécie, anos de pesquisa demonstraram que existem diferenças genéticas e fisiológicas que são particulares a cada uma delas. Em um estudo comparativo entre 40 estirpes de rizóbios, Boddey e Hungria (1997), evidenciaram a existência de diferenças fenotípicas marcantes entre as espécies *B. elkanii* e *B. japonicum*, em relação a diversos parâmetros. Entre estes se destacam: a) As estirpes pertencentes à espécie *B. elkanii* apresentam resistência aos antibióticos estreptomicina, espectinomicina e tetraciclina, enquanto que as estirpes pertencentes à espécie *B. japonicum* são sensíveis ou apresentam baixa resistência a estes antibióticos; b) A produção de ácido indol acético foi significativamente maior (aproximadamente seis vezes) nas estirpes de *B. elkanii* do que nas estirpes de *B. japonicum*. Entre as estirpes analisadas, os autores incluíram USDA 110, a qual é uma

estirpe referência para a espécie *B. japonicum*, e SEMIA 587, pertencente à espécie *B. elkanii* e que foi isolada, em 1967, de solos cultivados com soja no Estado do Rio Grande do Sul (Peres, 1979).

Anteriormente aos estudos de Boddey e Hungria (1997), Stanley, em 1985, já havia evidenciado polimorfismos genéticos entre as estirpes pertencentes às espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, que, previamente à sua separação em espécies, eram divididas em genótipo I e genótipo II, respectivamente. Usando como sonda um fragmento de DNA contendo os genes *nifDH* e outro contendo os genes *nod*, ambos de *Rhizobium meliloti*, o autor separou marcadamente esses dois grupos. Resultados similares foram obtidos por Minamisawa (1990), que, utilizando como sonda os genes *nifDK* e *nifE*, dividiu os grupos claramente em genótipos I e II. A ausência de atividade de hidrogenase nas estirpes de *B. elkanii* foi confirmada pelos experimentos de hibridização realizados por Minamisawa (1992), nos quais apenas nos DNAs extraídos de estirpes de *B. japonicum* foram obtidas bandas de hibridização. Finalmente, em 1993, Rumjanek e colaboradores, através do seqüenciamento parcial da região codificadora do gene do rRNA 16S, demonstraram que uma região de 188 pares de bases era suficiente para gerar agrupamentos que separaram *B. japonicum* de *B. elkanii*. Atualmente, a estirpe *B. japonicum* USDA 110 é a única representante do gênero *Bradyrhizobium* que possui seu genoma completamente seqüenciado (Kaneko *et al.*, 2002). Em contraste, um número muito pequeno de seqüências correspondentes ao genoma de *B. elkanii* está disponível e existem poucos trabalhos publicados sobre a genética desta espécie. As principais seqüências publicadas são relativas à região de genes ribossomais, genes *nif* e genes *nod* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos - NCBI-USA).

A identificação de diferenças que ocorrem naturalmente entre estirpes bacterianas pode acelerar a compreensão de certas características, tais como competitividade e especiação ecológica, e esclarecer o processo de evolução genômica (Guo *et al.*, 2005). A Análise da Diferença Representacional (RDA, do inglês, *Representational Difference Analysis*) é uma técnica bastante útil para revelar seqüências únicas entre dois genomas ou transcriptomas semelhantes, que vem sendo muito utilizada (Guo *et al.*, 2005; Lancashire *et al.*, 2007; Barcellos *et al.*, 2009). Essa metodologia possibilita o acesso a respostas a questões frequentes a respeito da expressão diferencial de genes e variabilidade genômica. Um exemplo é a sua utilização na identificação de expressão diferencial entre células

tumorais e células normais (Hollestelle e Schutte, 2005). Microbiologistas também obtiveram sucesso em revelar fatores de virulência, comparando genomas de microrganismos patogênicos com os genomas de suas estirpes correlatas não-patogênicas (Felske, 2002).

A metodologia de RDA foi primeiramente descrita por Lisitsyn e colaboradores (1993). Nesta técnica são preparadas duas populações de DNA, que são chamadas de *amplicons*. A população de DNA da qual se pretende obter seqüências únicas é chamada de *tester* e a outra é chamada de *driver*. O princípio da técnica é a hibridização subtrativa entre as duas populações de fragmentos (*tester* e *driver*), com o enriquecimento de seqüências únicas pertencentes a uma dessas populações (*tester*). Após diversas etapas de hibridização subtrativa, os fragmentos únicos à população *tester* são clonados em vetores e submetidos ao seqüenciamento. A análise das seqüências revela aquelas que são exclusivas da população *tester*.

Modificações da técnica de RDA foram geradas desde a sua criação em 1993. Uma dessas modificações utiliza a produção apenas de um *amplicom tester*, com o DNA *driver* não sendo amplificado, mas, sim, clivado aleatoriamente para gerar fragmentos de diversos tamanhos, que serão utilizados nas etapas de hibridização (Tinsley e Nassif, 1996). A técnica, apesar de laboriosa e complexa, tem apresentado sucesso na identificação de seqüências únicas de procariontes e é uma ferramenta muito útil para os microbiologistas moleculares. Guo e colaboradores (2005) utilizaram a técnica de RDA para comparar o genoma de uma estirpe de laboratório de *Sinorhizobium meliloti* (Rm1021) com o de uma estirpe padrão (ATCC 9930), a fim de identificar seqüências presentes no DNA de uma estirpe e ausentes no DNA da outra. Nesse trabalho, os autores identificaram vários grupos de seqüências no genoma da estirpe ATCC 9930 que não estavam presentes no genoma da estirpe Rm1021. Entre as 85 novas regiões de DNA examinadas, 55 não apresentaram homologias significativas com quaisquer outras seqüências disponíveis nos bancos de dados. Além disso, esses mesmos autores utilizaram 12 das 85 novas seqüências para a análise da distribuição destas em uma coleção de 59 estirpes naturais de *S. meliloti*, e concluíram que uma alta taxa de ganho e perda de material genético deve ter ocorrido entre os genomas das estirpes de *S. meliloti* analisados.



## 2. Justificativa

Como mencionado anteriormente, *B. japonicum* e *B. elkanii*, embora no passado tenham pertencido uma mesma espécie, suas estirpes apresentam diferenças consideráveis, tanto em nível de fenótipo, quanto em nível genético. Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo, o qual compõe o Núcleo de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética da UFRGS, confirmaram ainda mais essas observações. Tais resultados indicaram, por exemplo, que estirpes de *B. elkanii* são capazes de produzir sideróforos quando multiplicadas em meio de cultura com pouca disponibilidade de ferro, enquanto que estirpes de *B. japonicum* não são capazes de multiplicação no mesmo meio (A. Ambrosini, com. pessoal). Esse resultado sugere a presença de genes envolvidos na síntese de sideróforos no genoma de *B. elkanii*, que não estariam presentes no genoma de *B. japonicum*. De fato, a procura *in silico* por genes relacionados à síntese dessas moléculas no genoma da estirpe *B. japonicum* USDA110, a qual é a única do gênero a ter o genoma seqüenciado, não apresentou resultados positivos, embora tenham sido encontrados genes relacionados a diversos receptores de sideróforos (homólogos de *fhuA* e *fegA*, A. Ambrosini, com. pessoal). Outros estudos realizados pelo nosso grupo sugerem que os genomas dessas duas espécies de *Bradyrhizobium* apresentam diferenças significativas na organização de genes envolvidos no sistema de secreção do tipo 3 (T3SS, S. Campos, com. pessoal).

Devido à importância ecológica, ambiental e econômica gerada pela FBN, e o uso em larga escala de inoculantes nas lavouras de soja com as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* no Brasil, associado ao pouco conhecimento molecular em relação à espécie *B. elkanii* e às evidentes diferenças genômicas observadas, faz-se necessário um maior aprofundamento no conhecimento e caracterização do genoma de *B. elkanii*. Esse conhecimento genômico poderá ajudar na compreensão das diferenças fisiológicas encontradas entre essas duas espécies e servir como base na caracterização de estirpes isoladas de nódulos de soja.

### 3. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi o de comparar os genomas das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* através da técnica de Análise de Diferença Representacional (RDA, *Representational Difference Analysis*), a fim de identificarmos seqüências únicas ao genoma de *B. elkanii*.

Os objetivos específicos foram:

- a) Relacionar as seqüências únicas de *B. elkanii* obtidas a seqüências de genes conhecidos, descritas nos bancos de dados;
- b) Relacionar as diferenças fisiológicas entre *B. elkanii* e *B. japonicum* com as seqüências gênicas obtidas a partir da biblioteca gerada por RDA.

## CAPÍTULO I

---

**Application of representational difference analysis to identify genomic differences  
between *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* species**

Submetido ao Periódico Microbiological Research

## **Application of representational difference analysis to identify genomic differences between *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* species**

René Arderius Soares and Luciane Maria Pereira Passaglia\*

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43312, sala 207b. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 91501-970

### **Abstract**

*Bradyrhizobium elkanii* is successful used in the formulation of commercial inoculants and, together with *B. japonicum*, it fully supplies the plant nitrogen demands. Despite the similarity between *B. japonicum* and *B. elkanii* species, several works demonstrated genetic and physiological differences among them. In this work Representational Difference Analysis (RDA) was used for genomic comparison between *B. elkanii* SEMIA 587, a crop inoculant strain, and *B. japonicum* USDA 110, a reference strain. Two hundred sequences were obtained. From these, 46 sequences belonged exclusively to *B. elkanii* strain, and 154 had homology to *B. japonicum* strain. From the 46 sequences with no homology to *B. japonicum*, 39 showed no homology with sequences in public databases and seven sequences showed homology with known proteins. These seven sequences were divided in three groups: homolog to other *Bradyrhizobium* strains, homolog to other nitrogen-fixing bacteria, and homolog to non nitrogen-fixing bacteria. These new sequences could be very useful to accelerate our knowledge concerning the molecular differences between these two species and the genomic evolution processes that occurred between them.

**Keywords:** *Bradyrhizobium*, Representational difference analysis, Nitrogen fixation, Genome comparison.

\*Corresponding author: lpassaglia@terra.com.br. Phone number: + 55 51 33089813 – Fax: + 55 51 33087311

## Introduction

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] can establish effective biological nitrogen fixation (BNF) symbiosis with species of fast-growing rhizobia (Chen et al., 2000; Hungria et al., 2001; Hungria et al., 2006) as well with species of slow growing bradyrhizobia, like *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), and *B. liaoningense* (Xu et al., 1995). In theory, the nitrogen sources available for soybean cultures are nitrogen fertilizers and BNF (Hungria et al., 2001). In Brazil, for example, the use of nitrogen as fertilizer is not recommended for soybean, as the inoculation with nitrogen-fixing bacteria fully supplies the plant nitrogen demands. Besides the saving generated annually by the inoculation (about US\$ 3 billion per year, Hungria et al., 2005), the practice avoids environmental pollution, very common when nitrogen fertilizers are employed. Since soybean Brazilian's fields lacked native bacteria able to nodulate this leguminous, the production of inoculants in this country started in the 1960s with North American strains (Cattelan and Hungria, 1994). Nowadays, only four *B. japonicum* and *B. elkanii* strains have been used in the formulation of Brazilian's commercial inoculants and they have resulted in an established population in most soils cropped with soybean (Ferreira et al., 2000). Of those recommended strains, SEMIA 587 and SEMIA 5019 belonged to the *B. elkanii* species (Rumjanek et al., 1993), while SEMIA 5080 and SEMIA 5079 belonged to the *B. japonicum* species (Lemos, 1994).

In the 1980s the genus *Bradyrhizobium* was originated from the slow-growing specie *Rhizobium japonicum* (Jordan, 1982). In the beginning the soybean-nodulating *B. japonicum* was the only specie described. To date, five additional species have been validly named in this genus, and besides *B. japonicum* other two species are able to nodulate *Glycine max*, *B. elkanii* and *B. liaoningense* (Willems, 2006). Despite the similarity between *B. japonicum* and *B. elkanii*, years of research demonstrated genetic and physiological differences among them. Boddey and Hungria (1997) when studying 40 soybean *Bradyrhizobium* strains showed remarkable differences between these two species according to the resistance to antibiotics, where *B. elkanii* SEMIA 587 was resistant to kanamycin, rifampicin, spectinomycin, streptomycin, carbenicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, tetracycline and erythromycin, while *B. japonicum* USDA 110 was resistant only to low levels of rifampicin and spectinomycin. These authors also found differences concerning to the production of indole acetic acid (IAA): *B. japonicum* strains accumulated

between 4.88 to 7.08  $\mu\text{M}$  of IAA  $\text{ml}^{-1}$ , while *B. elkanii* strains were able to accumulate about six times more (44.36  $\mu\text{M}$  of IAA  $\text{ml}^{-1}$ ). Genetics studies like the sequencing of *nifDK* and *nifE* genes (Minamisawa, 1990) and the 16S rRNA gene (Young et al., 1991), together with hybridization analysis with the *hup* gene (Minamisawa et al., 1992), *nifDH* genes, and homologous sequences of *nodD* gene (Stanley et al., 1985) also helped in the final division of *B. japonicum* and *B. elkanii* made by Kuykendall and coworkers (1992). However, up to now the majority of published works about the genus *Bradyrhizobium* are related to *B. japonicum* strains. Nowadays, *B. japonicum* USDA 110 (Kaneko et al., 2002) and *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (Giraud et al., 2007) are the only *Bradyrhizobium* species to have the whole genome sequenced. Concerning *B. elkanii* species little is published and known about it, especially in the field of genetics and genomics. Basically *nif*, *nod*, *recA*, *glnII*, and ribosomal genes sequences are found in the public databases.

The original Representational Difference Analysis (RDA) protocol was developed for detection of genomic differences between two genomes (Lisitsyn et al., 1993). The methodology has since been modified and employed as a sensitive method for cloning of differentially expressed genes (Aiello et al., 1994; Baeza et al., 2007; Bowler et al., 1999; Lei et al., 2008). Microbiologists also succeeded to reveal genomic differences by comparing bacterial strains belonging to the same species with contrasting properties (Barcellos et al., 2009; Guo et al., 2005). Briefly, the procedure relies on the generation of populations of DNA fragments from one DNA source. It is achieved by digestion of genomic DNA (gDNA) with a restriction endonuclease with a four-base pair recognition site, followed by adapter ligation that introduces a primer sequence. The cut and adapter ligated DNA of the strain which unique sequences are to be identified is called 'tester DNA'. The second genome fragments population is called 'driver DNA'. An excess of driver is mixed with tester to facilitate cross-hybridization forming double stranded hybridization products containing tester-tester homoduplexes, tester-driver heteroduplexes and driver-driver homoduplexes. The mixture is then subjected to a selective PCR with adapter specific primers in which the tester-tester fragments will be exponentially amplified while the other fragments will either be linearly amplified or not amplified at all. In order to enhance the enrichment of tester specific fragments, the hybridization and PCR rounds are repeated a number of times, usually three. The PCR products after each RDA round are termed differential products (DP).

Due to the ecological and environmental role of the BNF, the economy and efficiency of inoculants and their massive usage over soybean crops, it is urgent a better understanding of the *B. elkanii* genetics. This information will accelerate our knowledge concerning the molecular differences between these two species and the genomic evolution processes that occurred between them. To obtain such understanding *B. elkanii* SEMIA 587 and the reference strain *B. japonicum* USDA 110 were submitted to RDA experiment.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains, growth conditions and DNA extraction**

The rhizobial strains used in this study were the reference strain *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, and the crop inoculant strain *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, both were supplied by Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO, RS, Brazil). Each strain was grown on Yeast Mannitol Broth (10 g mannitol, 0.5 g potassium phosphate, 0.2 g magnesium sulphate, 0.1 g sodium chloride, 0.5 g yeast extract, water to one liter, pH 6.8) for seven days at 28°C in an orbital shaker. Genomic DNA from bacteria was extracted according to basic molecular biology protocols (Sambrook and Russell, 2001).

### **RDA (Representational Difference Analysis)**

The technique was modified from that described by Tinsley and Nassif (1996). DNA from *B. japonicum* strain USDA 110 was used as driver DNA and DNA from *B. elkanii* strain SEMIA 587 was used as tester DNA. To obtain driver DNA fragments between 1.0 and 10.0 kb gDNA was submitted to partial digestion with *Sau3AI* (Promega). The conditions to obtain fragments of the desired length were established in a partial restriction digestion pilot experiment (Sambrook and Russel, 2001). The optimum fragment size was obtained when 1 µg of gDNA was cleaved with 1.74 U of *Sau3AI* in 1 hour at 37°C.

Fifteen µg of driver DNA were used for the whole RDA experiment. One µg of tester gDNA were completely digested with *Sau3AI*, resulting in a population of fragments with 200-300 pb, that were purified by column (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega) and ligated to 500 pmol of each adapters NBam 12 (GATCCTCCCTCG) and NBam 24 (AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG). For the

subtractive hybridization was used the Oscillating Phenol Emulsion Reassociation Technique (OsPERT, Bruzel and Cheung, 2006). In the first round 50 ng of tester DNA was mixed with 5 µg of driver DNA, resulting in a rate of 1:100, and held for 15 min at room temperature to denature in a final volume of 34.6 µl of 0.3 N NaOH. Solution was neutralized with addition of 5.4 µl of 3 M MOPS, 50 µl of 1.5 M NaCl, 2 mM EDTA. Ten µl of buffer-saturated phenol pH 8.0 was added and mixed. The sample was heated at 65°C for 1 minute and put on ice to generate a phenol emulsion. Then it was placed in a thermal cycler (PCR Express ThermoHybaid Thermal Cycler) programmed for 99 cycles of 15 seconds at 25 °C and 15 seconds at 65 °C. The phenol was removed with chloroform and the supernatant was purified by column. Five µl of the hybridization was added to 100 µl of reaction mix without oligonucleotides (1X buffer, 0.25 mM of each dNTP, 25 mM of MgCl<sub>2</sub>, 2 U *Taq* Polymerase - Invitrogen) and incubated for 3 min at 72°C to fill in the ends of the reannealed fragments. After denaturation at 94 °C for 5 min and addition of the oligonucleotide NBam 24 (100 pmol) the hybridized fragments were amplified by PCR (30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 62 °C, and 1 min at 72 °C followed by 5 min at 72 °C - PCR Express ThermoHybaid Thermal Cycler). The PCR products were again purified by column. An aliquot of these purified fragments was separated for a 1:10 dilution. The rest of them were treated with 1 U of Mung Bean Nuclease (Promega) for 15 min and column purified. Two PCR were performed, one reaction used 2 µl of the 1:10 dilution as template and the other reaction used 10 µl of the Mung Bean treated fragments as template. These PCR were performed as above described without the filling step. Next, the adapters of the differential products 1 (DP1) were removed by *Sau3AI* cleavage and a new set of adapters was ligated to DP1 [JBam 12 (GATCCGTTTCATG) and JBam 24 (ACCGACGTCGACTATCCATGAACG)]. The new adapter ligated DP1 (5 ng) was used in the second round of subtractive hybridization with 5 µg of driver DNA in a rate of 1:1000, and selective amplification was performed as in the first round. The third and final round was performed as described for the previous rounds but with adapters RBam 12 (GATCCTCGGTGA) and RBam 24 (AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG); 500 pg of DP2 was hybridized with 5 µg of driver DNA resulting in a rate of 1:10000.

### **Construction of subtractive libraries and sequencing**

An aliquot of the final RDA products (DP3 fragments) was filled in with Klenow



fragment and phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (Promega). Upon heat inactivation, the samples were column purified and ligated to *Sma*I-digested and dephosphorylated pUC18 vector. *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells were heat-shock transformed with the ligation products. White *Escherichia coli* colonies were selected and extracted plasmids were sequenced in both directions in the ACT Gene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer and M13 universal primers. Labeling reactions were performed in a Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler. The sequences were analyzed with the Staden Package software (v. 1.7.0). This program consists of a series of tools for DNA sequence preparation (Pregap4), assembly (Gap4), editing (Gap4) and DNA/protein sequence analysis (Spin). It is an open source software (BSD license) and it is hosted on <http://www.sourceforge.net>. The final resulting sequences were compared to the GenBank database using the BLASTN program.

## **Results**

### **RDA procedure**

Three rounds of subtractive hybridization and kinetic enrichment were performed using DNA from *B. elkanii* SEMIA 587 as tester and DNA from *B. japonicum* USDA110 as driver. As expected, exponential amplification of fragments specific to the tester DNA was obtained (see below). Linear amplification of fragments that were present on either DNA populations (tester and driver) was also observed. Several works had suggested the use of Mung bean nuclease to eliminate or reduce the unwanted linear amplification during the amplification step (Pastorian et al., 2000; Taylor et al., 2003) while others suggested that a 1:10 dilution is enough for the achievement of this proposal (Allen et al., 2003). Both alternatives were used in the present work during the PCR step. As similar amplifications results were achieved using either Mung bean or 1:10 dilution as template, both amplifications products were mixed and used as one in the following RDA rounds.

### **BLAST Results**

Several genetic differences between DNAs from *B. japonicum* USDA110 and *B. elkanii* SEMIA 587 strains were successfully isolated by RDA methodology. After the three rounds of subtractive hybridization and kinetic enrichment the resultant products

were used to construct a RDA library (Figure 1). The pUC18 cloned fragments were sequenced, analyzed by Staden Package and screened for homology with those available on the GenBank database using BLASTN program. As the complete genome sequence of *B. japonicum* USDA110 is also available on GenBank database the RDA library sequences could be screened directly against it.

From the 234 total sequences obtained, 52 were found redundant. One consensus sequence grouped 11 redundant sequences (this consensus sequence had no obvious homolog in the public database), five consensus sequences grouped three redundant sequences each, and 13 consensus sequences grouped two redundant sequences each. After grouping the redundancy 200 RDA unique sequences were obtained. Forty six sequences among the 200 belonged exclusively to the tester strain *B. elkanii* SEMIA 587, and 154 had homology to the driver strain *B. japonicum* USDA110. The 154 sequences with homology to the genome of *B. japonicum* USDA110 were divided in five groups according to their identity (Table 1).

From the 46 sequences with no homology to *B. japonicum* USDA 110 genome, 39 showed no homology with sequences in public databases and seven sequences showed homology with known proteins. These seven sequences were divided in three groups: homolog to other *Bradyrhizobium* strains, homolog to other nitrogen-fixing bacteria, and homolog to non nitrogen-fixing bacteria. The group of homolog to other *Bradyrhizobium* strains was composed by two clones: clone i5 was homolog to a putative toxin secretion ABC transporter from *Bradyrhizobium* sp. ORS278, and clone i29 was homolog to a putative carboxylase like RuBisCO small subunit from the photoorganotroph *Bradyrhizobium* sp. BTA1. The group of homolog to other nitrogen-fixing bacteria was composed by three clones: clone i150 was homolog to a 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase alpha-subunit of *Mesorhizobium loti*, clone i170 was homolog to a conserved hypothetical protein of *Rhodopseudomonas palustris*, and clone ii23 was homolog to a virulence factor MVIN family protein of *Xanthobacter autotrophicus* Py2. The group of homolog to other non nitrogen-fixing bacteria was also composed by two clones: clone i65 was homolog to a peptidase M19 of *Sphingopyxis alaskensis* RB2256, and clone i157 was homolog to a conserved hypothetical protein of *Nitrobacter winogradsky*. Table 2 shows the complete information about these data.

### **Sequences belonging exclusively to both *B. japonicum* and *B. elkanii* strains**

Besides the exclusive *B. elkanii* SEMIA 587 sequences, three sequences of *B. elkanii* SEMIA 587 that matched only with *B. japonicum* USDA 110 and no other organism were found. They were: clone i184 (107 pb length) that showed 77% of identity with an probable transcriptional regulator, clone i92 (196 pb length) that showed 94% of identity with a transcriptional regulatory protein, and clone i176 (91 pb length) that showed 74% of identity with an intergenic region (74 bp at 3' side of *bsl6114* and 162 bp at 5' side of *blr6113*, respectively, a hypothetical protein and an unknown protein).

### **Sequence acquisition numbers**

GenBank accession numbers of described unique tester sequences are: clone i5, FJ624080; clone i29, FJ624081; clone i150, FJ624082; clone i170, FJ624083; clone ii23, FJ624084; clone i65, FJ624085, and clone i157, FJ624086.

## **Discussion**

### **RDA strategy**

There are two basic RDA protocols usually performed to find genomic unique sequences: The original protocol described by Lisitsyn and coworkers (1993) and the modification of the RDA procedure described by Tinsley and Nassif (1996). In the standard RDA approach, chromosomal DNAs of both tester and driver DNAs are digested to completion with *Bgl*III and complementary oligonucleotides are ligated to them. A 'representation' of both sets of fragments is generated using PCR. Following amplification, oligonucleotides from the tester are digested off and the tester is ligated to a new ones. Both 'representations' are used in the hybridization step. In the Tinsley and Nassif (1996) procedure tester DNA is digested to completion with *Sau*3AI to generate a pool of smaller fragments than those generated by *Bgl*III digestion. Chromosomal DNA from the driver strain is sheared mechanically by 60 passes through a 30 gauge needle to generate fragments in the 3 kb to 4 kb range. *Sau*3AI digested tester DNA is ligated directly to oligonucleotides. Tester and sheared driver are mixed and hybridized. Calia and coworkers (1998) made a comparison of these two protocols while studying two strains of *Vibrio cholerae*. Although the two methods can be used, the second was suggested to yield a more complete set of different products for analyzing genomic differences. In the present work

the Tinsley and Nassif (1996) RDA protocol was used with some modifications. Instead shearing mechanically the driver genome by passes through a 30 gauge needle the driver DNA was partially digested with the same *Sau3AI* restriction enzyme (Sambrook and Russell, 2001). Fragments ranging from 1 kb to 10 kb were chosen to perform the RDA experiment.

From the 200 unique sequences, out of 234 sequences that were obtained, 46 had no homology to the driver, indicating that the RDA library constructed was not extinguished and more unique sequences could be obtained through more sequencing. The method applied in this work yielded a proportion of approximately 20% of unique tester fragments.

The option to compare *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, which has its whole genome sequenced, had proved to be a valuable choice. Since the complete genome sequence of *B. japonicum* USDA 110 is available in public databases, a direct comparison of the data obtained from tester DNA through sequencing could be easily performed, avoiding the time and labor consuming Southern blot experiment to the validation of the RDA procedure. Additional information were also obtained like those regarding the tester sequences that have some identity with driver sequences (see Table 1), and the identification of sequences that belong exclusively to *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 and *B. japonicum* USDA 110 strains.

### **Hybridization step**

Usually a high concentration of driver DNA (20 to 40 µg) and time (24 hours) is required during the hybridization step when performing RDA experiment (Allen et al., 2003; Barcellos et al., 2009; Calia et al., 1998; Lisitsyn et al., 1993). Phenol emulsion reassociation technique (PERT) enhances the rate of DNA hybridization in solution over typical hybridization conditions and has been used to reassociate DNA in subtraction based genomic experiments (Kunkel et al., 1985; Nishi et al., 2002; Shiloh et al., 1987). The Oscillating Phenol Emulsion Reassociation Technique (OsPERT) (Bruzel and Cheung, 2006) is a modification of PERT (Kohne et al., 1977; Miller and Riblet, 1995). This modification enhances the rate of reassociation of complex DNA by cycling the ssDNA using a high temperature step (15 s at 65°C) which dissolves the phenol into the aqueous phase, and a low temperature step (15 s at 25°C) which regenerates the phenol emulsion. The interface between water and phenol in the microspheres formed and its agitation

creates a site where hybridization occurs, allowing the utilization of fewer amounts of DNA and performing the hybridization step in a much shorter time. By applying the OsPERT methodology in this work just 5 µg of driver DNA were used per round, moreover driver and tester DNAs were cycled 99 times in a 4 hours reaction, saving material and time.

### ***B. elkanii* SEMIA 587 unique sequences**

The RDA approach revealed 46 sequences without homology to *B. japonicum* USDA 110 genome. From these, 39 showed no homology with sequences in public databases and seven showed homology with sequences of genes that codify proteins, some of them with known function.

The sequence carried by clone i29 was homolog to a putative carboxylase (small subunit) like Rubisco of *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. This enzyme catalyzes the biological reduction and assimilation of carbon dioxide gas to organic carbon and it is the key enzyme responsible for the bulk of organic matter found on earth. Its biochemical role is chiefly as the central part of the Calvin–Benson–Basham (CBB) reductive pentose phosphate pathway where it combines CO<sub>2</sub> with ribulose 1,5-bisphosphate to form two molecules of 3-phosphoglycerate (Badger and Bek, 2008). Rubisco forms I and II are directly involved in carbon metabolism and have a well recognized autotrophic CO<sub>2</sub> fixing function. These enzymes are found in a wide range of chemo, organo, and phototrophs, occurring in bacteria, algae, and plants. Form III Rubisco has only been found in archaea and form IV enzymes have been termed ‘Rubisco-like’ proteins and have been shown to be functional in the methionine salvage pathway in many bacteria. (Ashida et al., 2003). The driver strain *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 has an organotroph metabolism; it means no photosynthesis is made. The Rubisco gene found in *B. elkanii* SEMIA 587 is homolog to Rubisco class I of *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, a facultative photoorganomixotroph bacterium (Badger and Bek, 2008). This class of Rubisco has a well recognized autotrophic CO<sub>2</sub> fixing function. This is the first evidence of a Rubisco gene in the strain of study and point out the necessity of further study in order to evaluate if this gene is functional in *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 making this bacterium able to fix CO<sub>2</sub> and make photosynthesis.

The sequence carried by clone i5 was homolog to the toxin secretion ABC

transporter (*hlyB* like protein) of *Bradyrhizobium sp.* ORS278. ABC (ATP Binding Cassette) proteins constitute a specific class of ATPases that are involved with a wide variety of transport processes, including both inward (import) and outward (export or secretion), the latter being conserved from bacteria to humans (Holland and Blight, 1999; Holland et al., 2003). The most studied of these transporters are key components of the Type I secretion pathway in Gram-negative bacteria. The hemolysin B (*hlyB*) protein of *E. coli* is required in conjunction with hemolysin D (*hlyD*) and the external membrane protein TolC for the secretion of hemolysin-A (*hlyA*) protein (Higgins, 1992; Wandersman and Delepelaire, 1990). The Type I secretion pathway does not only export *hlyA* but also a great range of substrate like, proteases, lipases and different toxins. The substrate can be small as 19 kDa or even protein complexes of 800 kDa (Holland et al., 2005). The systems constitute a complex of three proteins, a transporter located in the cytoplasmic membrane, a periplasmic membrane fusion protein, and an outer membrane channel protein. When the complex is assembled a periplasm crossing channel is formed (Gentschev et al., 2002).

Clone i150 contained a DNA fragment which sequence had showed homology to *Mesorhizobium loti* 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase alpha-subunit. This enzyme catalyzes an important reaction in the anaerobic metabolism of phenolic compounds, i.e. the reductive removal of an aromatic hydroxyl group. Anaerobic metabolism is based on a reductive chemistry, by which groups at the ring are often reductively removed and dearomatization of the aromatic ring structures proceeds by reductions. One central intermediate is benzoyl-CoA, which is dearomatized by reduction. Most natural aromatic substrates are hydroxylated compounds that require reductive dehydroxylation of phenolic hydroxyl groups if benzoyl-CoA is to be formed (Breese and Fuchs, 1998).

Homolog to *Xanthobacter autotrophicus* Py2 virulence factor MVIN family protein was first described in *Salmonella typhimurium*. This protein has been shown to be an important virulence factor for this organism when infecting mouse (Kutsukake et al., 1994) and it is part of a *Sinorhizobium meliloti* essential operon (Rudnick et al., 2001). Moreover, the *mviN* gene in *Rhizobium tropici* was found to be involved in motility (O'Connell et al., 1998) and a mutation in *mviN* gene in the soft rot-causing bacterium *Pseudomonas viridiflava* was shown to influence motility as well as virulence (Czelleng et al., 2006). However, the biochemical function of the product encoded by *mviN* and similar genes is not fully understood (Hvorup et al., 2003). A 69% of homology was found between the

sequence present at clone ii23 and the gene coding for the Py2 virulence factor MVIN from *X. autotrophicus*. It will be interesting to perform mutagenesis studies in *B. elkanii* in order to verify if this gene is also involved in the motility or other process in this bacterium.

The sequence carried by clone i65 was homolog to *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 peptidase M19 or renal dipeptidase, which is an enzyme that in humans is a membrane bound glycoprotein involved in the hydrolysis of dipeptides and is well-known as the sole metabolic enzyme for penem and carbapenem  $\beta$ -lactam antibiotics in mammals. These antibiotics are presently prescribed in clinical practice with the dipeptidyl inhibitor cilastatin (Nitanai et al., 2002). Peptidases are grouped into clans and families. Clans are groups of families for which there is evidence of common ancestry. Families are grouped by their catalytic type: A, aspartic; C, cysteine; G, glutamic acid; M, metallo; S, serine; T, threonine; and U, unknown. In metalloproteases a divalent cation, usually zinc, activates the water molecule. The metal ion is held in place by amino acid ligands, usually three in number (Rawlings and Barrett, 1995). As already mentioned, *B. elkanii* SEMIA 587 was found to be more resistant to antibiotics than *B. japonicum* USDA 110 (Boddey and Hungria, 1997). Bacteria in general has a wide range of mechanisms to resist the actions of noxious agents: enzymatic reactions like  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes the  $\beta$ -lactam ring of antibiotics, the mutational alteration of the drug target to reduce the target's affinity for the drug or to reduce the permeability of the cell envelope. One example of the last one is the use of active transporters that belong to the ATP binding cassette (ABC) superfamily and utilize the free energy of ATP hydrolysis to expel drugs from the cell (Putman et al., 2000; Walsh, 2000). Two unique tester sequences that could be involved in antibiotic resistance of *B. elkanii* were found in this work. They are the homolog to the peptidase M19 that has the ability to cleave  $\beta$ -lactam ring of penem and carbapenem antibiotics like carbenicillin and the homolog to the toxin secretion ABC transporter (*hlyB* like protein) of *Bradyrhizobium sp.* ORS278 that could be involved in the exporting of noxious molecules from the bacterial cell.

The two remaining unique *B. elkanii* sequences identified by the RDA approach were both classified as conserved hypothetical proteins with no function predicted yet. One of them (clone i170) was homolog to a DNA region from *Rhodopseudomonas palustris* genome and the other (clone i157) had showed a homology of 76% to a genomic DNA

region of *Nitrobacter winogradskyi*.

The possibility of RDA technique to identify unique sequences had been confirmed in this work, since several DNA fragments unique to the tester DNA were obtained. These fragments included a large number of sequences that were not present in the genome of *B. japonicum* USDA 110. Some of the genes identified could be involved in mechanisms related to antibiotics resistance, motility, photosynthesis and transport, and could be the responsible for the phenotypic differences found between these two bacterial species. Further studies will be necessary to confirm the expression and functionalities of the predicted gene products.

#### *Acknowledgements*

The authors thank Dr. Irene S. Schrank and Msc. Ricardo Cecagno (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brazil) for their valuable help for the execution of the RDA experiment. This work was financed by a grant and fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil).

#### **References**

Aiello LP, Robinson GS, Lin YW, Nishio Y, King GL. Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91(13):6231-6235

Allen NL, Penn CW, Hilton AC. Representational difference analysis: critical appraisal and method development for the identification of unique DNA sequences from prokaryotes. *J Microbiol Methods* 2003;55(1):73-81

Ashida H, Saito Y, Kojima C, Kobayashi K, Ogasawara N, Yokota A. A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* 2003;302:286–290.



Baeza LC, Bailao AM, Borges CL, Pereira M, Soares CMA, Giannini MJSM. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. *Microbes Infect* 2007;9(12-13):1415-1421.

Badger MR and Bek EJ. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO<sub>2</sub> acquisition by the CBB cycle. *J Exp Bot* 2008;59(7):1525–1541.

Barcellos FG, Batista JSS, Menna P, Mariângela H. Genetic differences between *Bradyrhizobium japonicum* variant strains contrasting in N<sub>2</sub>-fixation efficiency revealed by representational difference analysis. *Arch Microbiol* 2009;191:113-122.

Boddey LH and Hungria M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biol Fertil Soils* 1997;25:407–415.

Bowler LD, Hubank M, Spratt BG. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999;145:3529–3537.

Breese K and Fuchs G. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* Prosthetic groups, electron donor, and genes of a member of the molybdenum-flavin-iron-sulfur proteins. *Eur J Biochem* 1998;251:916-923.

Bruzel A and Cheung VG. DNA reassociation using oscillating phenol emulsions. *Genomics* 2006;87:286-289.

Calia K, Waldor M, Calderwood S. Use of representational difference analysis to identify genomic differences between pathogenic strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1998;66:849-852.

Cattelan AJ and Hungria M. Nitrogen nutrition and inoculation. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, editor. Tropical soybean – improvement and production. Rome: FAO; 1994.

Chen LS, Figueredo A, Pedrosa FO, Hungria M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:5099–5103.

Czelleng A, Bozso Z, Ott PG, Besenyi E, Varga GJ, Szatmári A, Király L, Klement Z. Identification of Virulence-Associated Genes of *Pseudomonas viridiflava* Activated During Infection by Use of a Novel IVET Promoter Probing Plasmid. *Curr Microbiol* 2006;52:282–286.

Ferreira MC, Andrade DS, Chueire LMO, Takemura SM, Hungria M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biol Biochem* 2000;32:627–637.

Gentschev I, Dietrich G, Goebel W. The *Escherichia coli* alphahemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 2002;1:39-45.

Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck W L, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Vermeglio A, Medigue C, Sadowsky M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 2007;316:1307-1312.

Guo H, Sun S, Finan TM, Xu J. Novel DNA Sequences from Natural Strains of the Nitrogen-Fixing Symbiotic Bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7130-7138.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67–113.

Holland IB and Blight MA. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 1999;293:381–399.

Holland IB, Benabdelhak H, Young J. ABC Proteins: From Bacteria to Man. London:Academic Press; 2003.

Holland IB, Schmitt L, Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol* 2005;22(1-2):29-39.

Hungria M, Chueire LMO, Coca RG, Megías M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem* 2001;33:1349–1361.

Hungria M, Franchini JC, Campo RJ, Graham PH. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: Werner D and Newton WE editors. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. NY: Springer; 2005.

Hungria M, Chueire LMO, Megias M, Lamrabet Y, Probanza A, Gutierrez-Manero FJ, Campo RJ. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant Soil* 2006;288:343– 356.

Hvorup RN, Winnen B, Chang AB, Jiang Y, Zhou XF, Saier MH Jr. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur J Biochem* 2003;270:799–813.

Jordan DC. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:136–139.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A,

Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 2002;9:225-256.

Kohne DE, Levison SA, Byers MJ. Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* 1977;16:5329–5341.

Kunkel L M, Monaco A P, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4778–4782.

Kutsukake K, Okada T, Yokoseki T, Iino T. Sequence analysis of the *flgA* gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, *flgN*. *Gene* 1994;143: 49-54.

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 1992;38:501–505.

Lei L, Sun C, Lu S, Feng X, Wang J, Han W. Selection of serotype-specific vaccine candidate genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and heterologous immunization with *Propionibacterium acnes*. *Vaccine* 2008;26(49):6274-6280.

Lemos EGM. Classificacao e identificacao de bradirrizobios que nodulam soja por analise de padroes isoenzimaticos, sorologia, morfologia de colonias e atividade de hidrogenase. Sao Paulo: UNESP (Tese);1994.

Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993;259:946-51.

Miller RD and Riblet R. Improved phenol emulsion DNA reassociation technique (PERT)

using thermal cycling. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2339–2340.

Minamisawa K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. *Plant Cell Physiol* 1990;31:81–89.

Minamisawa K, Seki T, Onodera S, Kubota M, Asami T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2832–2839.

Nishi Y, Akiyama K, Korf BR. Characterization of N-myc amplification in a human neuroblastoma cell line by clones isolated following the phenol emulsion reassociation technique and by hexagonal field gel electrophoresis. *Mamm Genome* 2002;2:11–20.

Nitanai Y, Satow Y, Adachi H, Tsujimoto M. Crystal Structure of Human Renal Dipeptidase Involved in b-Lactam Hydrolysis. *J Mol Biol* 2002;321:177–184.

O'Connell KP, Raffel SJ, Saville BJ, Handelsman J. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. *Microbiology* 1998;144:2607-2617.

Pastorian K, Hawel L, Byus CV. Optimization of cDNA Representational Difference Analysis for the Identification of Differentially Expressed mRNAs. *Anal Biochem* 2000;283:89–98.

Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:672–693.

Rawlings ND and Barrett AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. *Meth Enzymol* 1995;248:183-228.

Rudnick PA, Arcondeguy T, Kennedy CK, Kahn D. *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2001;183(8):2682–2685.

Rumjanek NG, Dobert RC, van Berkum P, Triplett EW. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. Appl Environ Microbiol 1993;59:4371–4373.

Sambrook J and Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 2001.

Shiloh Y, Rose E, Colletti-Feener C, Korf B, Kunkel LM, Latt SA. Rapid cloning of multiple amplified nucleotide sequences from human neuroblastoma cell lines by phenol emulsion competitive DNA reassociation. Gene 1987;51:53–59.

Stanley JS, Brown GG, Verma DPS. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. J Bacteriol 1985;163:148–154.

Taylor DL, Ward PN, Rapier CD, Leigh JA, Bowler LD. Identification of a Differentially Expressed Oligopeptide Binding Protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by Representational Difference Analysis of cDNA. J Bacteriol 2003;185(17):5210–5219.

Tinsley CR and Nassif X. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. Proc Natl Acad Sci 1996;93:11109–11114.

Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 2000;406:775–781.

Wandersman C and Delepelaire P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc Natl Acad 1990;87:4776–4780.

Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant Soil 2006;287:3–14.

Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the

root nodules of soybean. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:706–711.

Young JPW, Downer HL, Eardly BD. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J Bacteriol* 1991;173:2271–2277.

Table 1 Grouping of 154 sequences with homology to *B. japonicum* USDA110 based in their identity (GenBank database)

Group	Number of sequences	Percentage of total analyzed sequences <sup>a</sup>	Identity <sup>b</sup>
I	2	1%	60% to 69%
II	9	4.5%	70% to 79%
III	19	9.5%	80% to 89%
IV	68	34%	90% to 99%
V	56	28%	100%

<sup>a</sup> Percentage based on the 200 consensus sequences. Sequences with no homology to *B. japonicum* (46) represents 23%.

<sup>b</sup> Identity of the clone sequence related to their homolog sequence in *B. japonicum* USDA110

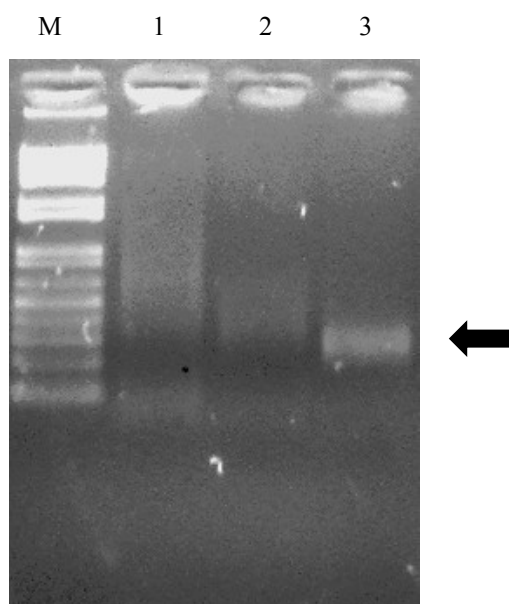


Table 2 List of clones with homology to known genes obtained through BLASTN

Group	Clone	Gene	Bacteria specie	Identities	Expected value	GenBank accession numbers
Homologs to other <i>Bradyrhizobium</i> strains	i5	Putative toxin secretion ABC transporter	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	150/186 (80%)	2e <sup>-40</sup>	FJ624080
	i29	Putative carboxylase, like RuBisCO, small subunit	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	76/99 (76%)	2e <sup>-11</sup>	FJ624081
Homologs to other nitrogen-fixing bacteria	i150	4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase alpha-subunit	<i>Mesorhizobium loti</i>	129/172 (75%)	1e <sup>-15</sup>	FJ624082
	i170	Conserved hypothetical protein	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	88/124 (70%)	5e <sup>-07</sup>	FJ624083
	ii23	Virulence factor MVIN family protein	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	127/183 (69%)	9e <sup>-12</sup>	FJ624084
Homologs to other non nitrogen-fixing bacteria	i65	Peptidase M19	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	95/124 (76%)	3e <sup>-16</sup>	FJ624085
	i157	Conserved hypothetical protein	<i>Nitrobacter winogradsky</i>	125/164 (76%)	1e <sup>-22</sup>	FJ624086

Figure legend:

Fig. 1 Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel of RDA products. Lane M is 1 Kb Plus Ladder (GibcoBRL); lane 1, first round of RDA products; lane 2, second round of RDA products; lane 3, third round of RDA products. Arrow indicates the band that was used for the library construction.



## CAPÍTULO II

---

**Utilização de seqüências únicas de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 obtidas por RDA (*Representational Difference Analysis*) como marcadores moleculares dessa espécie**

## Introdução

A aquisição de DNA através de transferência gênica horizontal (TGH) entre bactérias é uma das estratégias evolucionárias que contribuem para a formação da diversidade genética dos microrganismos encontrados no solo. Existem três processos diferentes pelos quais a TGH pode ocorrer: a conjugação, onde o material genético é transferido pelo contato entre as células; a transdução, onde o material genético é transferido através da infecção viral; e a transformação, onde o material genético é absorvido diretamente do ambiente pela célula. Para a transferência gênica obter sucesso o DNA exógeno deve tornar-se integrado no genoma bacteriano ou, de alguma forma, manter-se estável na célula recipiente (Arber, 2000; Curz e Davies, 2000).

No Brasil, a inoculação massiva de bradirrizóbios gerou o estabelecimento de populações na maioria dos solos onde a soja é cultivada. A área do cerrado brasileiro era, em princípio, livre de estirpes nativas de bradyrrizóbios. Nestas áreas, estirpes exóticas de *B. japonicum* e *B. elkanii* foram introduzidas há aproximadamente dez anos. Comparações entre as estirpes parentais e as estirpes reisoladas evidenciaram diferenças na morfologia, sorologia, fisiologia e na genética destes isolados. Além da variabilidade causada pelas condições ambientais estressantes dos cerrados, a TGH também é responsável pela variabilidade encontrada em estirpes naturalizadas (Barcellos *et al.*, 2007). Outro exemplo de transferência gênica entre rizóbios foi relatado por Minamisawa e colaboradores (2002), onde a transferência horizontal de genes *nod* foi verificada entre estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*, tanto no solo, quanto em co-cultivo em placas de Petri.

Atualmente, apenas quatro estirpes são autorizadas para uso em inoculantes comerciais no Brasil, são elas: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (FEPAGRO, 1999). Giongo e colaboradores (2008) através de análises por rep-PCR e AFLP de populações de bradirrizóbios de cinco diferentes localidades envolvidas com o cultivo de soja no Estado do Rio Grande do Sul (Ibirubá, Cachoeira do Sul, Santa Rosa, Vacaria e Dom Pedrito) verificaram um grande nível de diversidade genética inter e intrapopulacional. Uma biblioteca de 417 isolados ambientais de bradirrizóbios, coletados nas cinco localidades estudadas, foi mantida em glicerol 25% e à temperatura de -20°C no Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Estes isolados serão, posteriormente, classificados em nível

de espécie e serão utilizados na continuidade desse trabalho. Dessa forma, pretende-se utilizar algumas das sequências obtidas da biblioteca de RDA que se mostraram exclusivas ao genoma de *B. elkanii* para o desenho de oligonucleotídeos. Esses oligonucleotídeos servirão como marcadores moleculares de *B. elkanii* e serão utilizados com os DNAs extraídos dos bradirrízobios ambientais isolados, a fim de averiguar-se a ocorrência de TGH entre os genomas destas estirpes, tais como perda e/ou ganho de regiões gênicas.

### **Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores**

As sequências que originaram os oligonucleotídeos iniciadores foram selecionadas de forma a abranger todos os grupos de sequências identificados no Capítulo I dessa Dissertação: grupo com homologia a bradirrízobios, grupo com homologia a bactérias fixadoras de nitrogênio, grupo com homologia a bactérias não fixadoras de nitrogênio e também sequências onde não foram encontradas homologias nos bancos de dados. Na escolha das sequências que originaram os oligonucleotídeos também foram abrangidas sequências de genes já descritos e com função conhecida, sequências de proteínas hipotéticas conservadas e o grupo de sequências com função desconhecida e sem homologia nos bancos de dados.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados pelo programa Primer3 (Primer3: WWW primer tool:[http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). As sequências que foram escolhidas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foram as seguintes:

### **Seqüência homóloga a outra espécie de *Bradyrhizobium***

Clone I5, gene codificador de um transportador do tipo ABC (secretor putativo de toxina), homólogo ao de *Bradyrhizobium* sp.ORS278, 80% de identidade (150 pb/186 pb), valor  $e$  de  $2e^{-40}$ , número de acesso no GenBank FJ624080.

Oligo esquerdo: 5' GCTCGTCATCGACCAACC 3';

Oligo direito: 5' ACGACGAAACCGAAGCTG 3';

Tamanho do produto amplificado: 114 pb.

### Seqüências homólogas a outras espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio

- a) Clone I123, gene *mviN* (codificador de um fator de virulência da família MVIN), homólogo ao de *Xanthobacter autotrophicus* Py2, 69% de indentidade (127 pb/183 pb), valor e de  $9e^{-12}$ , número de acesso no GenBank FJ624084.  
Oligo esquerdo: 5' GGTCGGCGTCACTTCCTAT 3';  
Oligo direito: 5' ATCAGGTAGACCGCCTCGAA 3';  
Tamanho do produto amplificado: 162 pb.
- b) Clone I150, gene codificador da subunidade alfa da 4-Hydroxibenzoil-CoA redutase, homólogo ao de *Mesorhizobium loti*, 75% de identidade (129 pb/172 pb), valor e de  $1e^{-15}$ , número de acesso no GenBank FJ624082.  
Oligo esquerdo: 5' GCCCCTGCCCTGATATTT 3';  
Oligo direito: 5' CGAAGGAAGGCACCAAGG 3';  
Tamanho do produto amplificado: 125 pb.
- c) Clone I170, gene codificador de uma proteína hipotética conservada, homólogo ao de *Rhodopseudomonas palustris*, 70% de identidade (88 pb/124 pb), valor e de  $5e^{-7}$ , número de acesso no GenBank FJ624083.  
Oligo esquerdo: 5' CAGGGAGCCGACGAAGTAT 3';  
Oligo direito: 5' TCTTTCGGGATTCGTATTGC 3';  
Tamanho do produto amplificado: 115 pb.
- d) Clone I89, gene codificador de uma proteína hipotética conservada, homólogo ao de *Burkholderia phytofirmans* PsJN, 70% de identidade (98 pb/127 pb), valor e de  $9e^{-18}$ , número de acesso no GenBank FJ624081.  
Oligo esquerdo: 5' CGGCATCTATGGCTTCGT 3';  
Oligo direito: 5' GCGGCAGTGTTGTACCAGAG 3';  
Tamanho do produto amplificado: 100 pb.

### Seqüências homólogas a outras espécies de bactérias não-fixadoras de nitrogênio

- a) Clone I65, gene codificador da peptidase M19, homólogo ao de *Sphingopyxis alaskensis* RB2256, 75% de identidade (95 pb/124 pb), valor e de  $3e^{-16}$ , número de acesso no GenBank FJ624085.

Oligo esquerdo: 5' CAACCTCGGCAATCTCGAC 3';

Oligo direito: 5' AGCCCGCGACATCATTGT 3';

Tamanho do produto amplificado: 86 pb.

- b) Clone I157, gene codificador de uma proteína hipotética conservada, homólogo ao de *Nitrobacter winogradsky*, 76% de identidade (125 pb/164 pb), valor de  $1e^{-22}$ , número de acesso no GenBank FJ624086.

Oligo esquerdo: 5' CAAAGACCAAGGAGGACGAC 3';

Oligo direito: 5' CTGTCTTGGCGAACATCGT 3';

Tamanho do produto amplificado: 153 pb.

### **Seqüências sem homologia nos bancos de dados**

- a) Clone I93, tamanho da seqüência 160 pb.

Oligo esquerdo: 5' CTCCATTGACATCTGCAACC 3';

Oligo direito: 5' GCCGAATTCGTCACACTCAGTT 3';

Tamanho do produto amplificado: 133 pb.

- b) Clone I126, tamanho da seqüência 234 pb.

Oligo esquerdo: 5' CGAGGTCATCAAGAGCGAGT 3';

Oligo direito: 5' GAGCTCAGGCACAAGTTTCC 3';

Tamanho do produto amplificado: 186 pb.

- c) Clone I273, tamanho da seqüência 175 pb.

Oligo esquerdo: 5' AATTTGCCATTCGCTCCA 3';

Oligo direito: 5' GACAGCTCGACGCTGGAT 3';

Tamanho do produto amplificado: 138 pb.

### **Procedimentos experimentais e Resultados obtidos**

Os oligonucleotídeos iniciadores foram testados usando os DNAs de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* USDA 110 como moldes, na concentração de 20 ng por reação. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador do tipo PCR Express ThermoHybaid. As condições das reações foram: tampão 1 X, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 U *Taq* polimerase (Invitrogen)

em um volume final de 25  $\mu$ l, nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 65°C por 30 seg., 72°C por 30 seg., seguidos de um passo de extensão a 72°C por 5 min.

Todos os oligonucleotídeos iniciadores projetados amplificaram uma banda de tamanho esperado quando o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587, foi utilizado como molde. Em contraste, quando o DNA de *B. japonicum* USDA 110 foi utilizado como molde não se obteve bandas de amplificação (Figura 1).

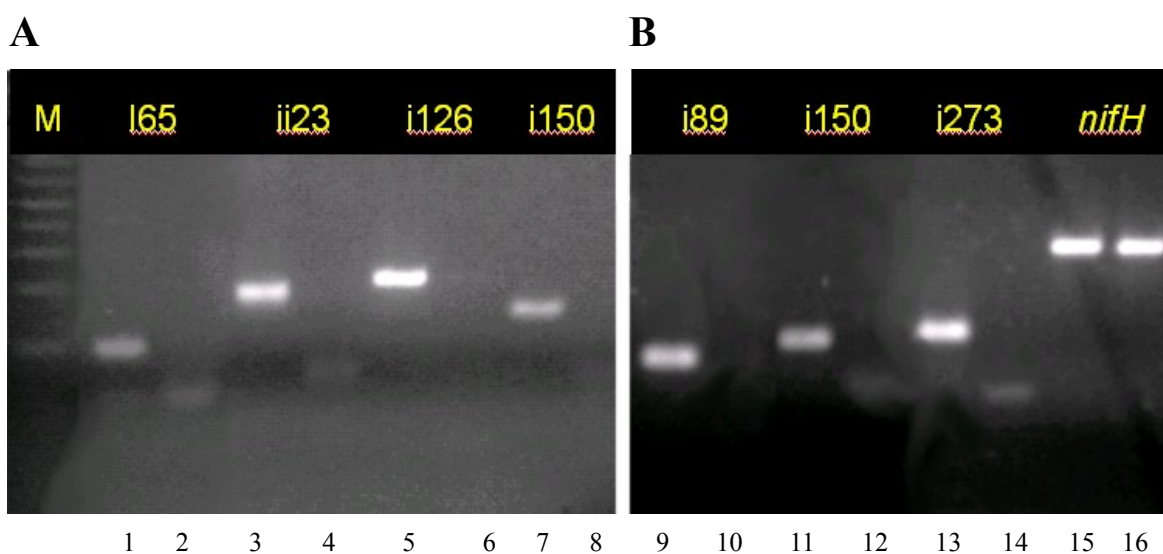


Figura 1. Géis de agarose 2% mostrando o resultado das PCRs com alguns dos oligonucleotídeos iniciadores (OI) específicos para *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587. DNA molde: canaletas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15, DNA de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587; canaletas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16, DNA de *B. japonicum* USDA 110. M) 1 Kb Plus Ladder (GibcoBRL); canaletas 1 e 2: OI i65 (86 pb); canaletas 3 e 4: OI ii23 (168 pb); canaletas 5 e 6: OI i126 (186 pb); canaletas 7 e 8: OI i150 (125 pb). B) canaletas 9 e 10: OI i89 (100 pb); canaletas 11 e 12: OI i150 (125 pb); canaletas 13 e 14: OI i273 (138 pb); canaletas 15 e 16: controle positivo OI do gene *nifH* (314 pb).



#### **4. Perspectivas**

Como mencionado anteriormente, pretende-se utilizar os oligonucleotídeos iniciadores nas populações de bradirrizóbios da coleção de amostras ambientais coletadas pela Dra. Adriana Giongo (Giongo *et al.*, 2008) provenientes de cinco localidades produtoras de soja do Estado do Rio Grande do Sul: Ibirubá, Cachoeira do Sul, Santa Rosa, Vacaria e Dom Pedrito, a fim de verificar possíveis alterações genéticas ocorridas nos genomas dos bradirrizóbios estabelecidos nestas regiões. Atualmente esta coleção está sendo recuperada do glicerol e os isolados ainda viáveis estão sendo cultivados em meio LM e submetidos a extração de DNA. Posteriormente tais isolados serão classificados em nível de espécie, através do método descrito por Giongo e colaboradores (2007).

## 5. Considerações Finais

A escolha de se comparar os genomas de *Bradyrhizobium elkani* SEMIA 587 e *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 deu-se pelo fato dessa última possuir o seu genoma totalmente seqüenciado e provou ser uma alternativa eficaz. Como o genoma de *B. japonicum* USDA 110 está disponível nos bancos de dados, uma comparação direta pôde ser realizada. Essa comparação com o genoma do *driver* permitiu a rápida validação da técnica de RDA, não sendo necessário realizar a validação com experimentos mais trabalhosos, como o Southern-*blot*. Informações adicionais também foram obtidas, como, por exemplo: a existência de regiões do *tester* que somente são homólogas ao DNA do *driver* e a de nenhum DNA de outra bactéria. É o caso dos clones i92 e i184, que apresentaram homologias com genes codificadores de proteínas reguladoras da transcrição.

O número total de seqüências não redundantes obtidas através da técnica de RDA foi o de 200 seqüências, mas este ainda não é o número final, visto que mais clones ainda podem ser seqüenciados até que toda a biblioteca seja esgotada. Estas 200 seqüências não redundantes foram originadas do agrupamento de 234 seqüências iniciais, ou seja, a redundância atual foi de aproximadamente 15%.

A técnica de RDA revelou 46 seqüências sem homologia a *B. japonicum*. Destas, 39 não apresentaram homologia com nenhuma seqüência descrita nos bancos de dados e sete mostraram homologia com seqüências de genes que codificam proteínas, alguns deles com função conhecida. Pode-se citar, por exemplo: o gene codificador de um transportador ABC (*hlyB like protein*) de *Bradyrhizobium* sp. ORS278, o gene que codifica a subunidade alfa da 4-Hydroxibenzoil-CoA redutase de *Mesorhizobium loti*; o gene *mviN* de *Xanthobacter autotrophicus* Py2, o gene que codifica a peptidase M19 de *Sphingopyxis alaskensis* RB225, e o gene que codifica a carboxilase de *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. Os dois clones remanescentes obtidos pela técnica de RDA foram ambos classificados como codificadores de proteínas hipotéticas conservadas, ainda sem função predita. Um deles é homólogo a uma região do genoma de *Rhodopseudomonas palustris* e o outro, a uma região do genoma de *Nitrobacter winogradskyi*.

As bactérias, em geral, possuem uma grande variedade de mecanismos para resistir a ação de agentes tóxicos, tais como: reações enzimáticas com  $\beta$ -lactamase, que hidroliza o anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos, mutações no alvo das drogas para diminuir a afinidade

com a mesma, e, também, a capacidade de reduzir a permeabilidade do envelope celular. Um exemplo deste último mecanismo é o uso de transportadores que pertencem ao grupo da superfamília ABC, que utilizam a energia da hidrólise do ATP para expelir uma grande variedade de substâncias para fora da célula. Duas únicas seqüências que podem estar envolvidas com a resistência aos antibióticos foram encontradas neste trabalho. Uma delas representa o gene que codifica a peptidase M19, que possui a habilidade de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico de antibióticos do tipo penem e carbapenem, como, por exemplo, a carbenicilina. O outro gene que pode estar envolvido com a resistência a antibióticos é o transportador ABC (*hlyB like protein*) que, como dito, pode estar envolvido com a exportação de moléculas nocivas para fora de célula.

O gene que codifica uma proteína semelhante à RuBisCo encontrado em *B. elkanii* SEMIA 587 é homólogo ao gene que codifica uma Rubisco de classe I de *Bradyrhizobium* sp. *BTail*, uma bactéria fotorganomixotrófica. Essa classe de RuBisCo tem uma reconhecida função autotrófica fixadora de CO<sub>2</sub>. Esta é a primeira evidência de um gene envolvido na síntese de uma Rubisco na estirpe de estudo. Testes serão necessários para avaliar a funcionalidade deste gene em *B. elkanii* SEMIA 587, sua capacidade fotossintética e fixadora de CO<sub>2</sub>.

A possibilidade da técnica RDA de identificar seqüências únicas foi confirmada neste trabalho, visto que vários fragmentos de DNA únicos ao DNA *tester* foram obtidos. Alguns desses genes, como já mencionado, podem estar envolvidos em mecanismos relacionados à resistência a antibióticos, motilidade, fotossíntese e transporte. Esses genes poderiam ser responsáveis por algumas das diferenças fenotípicas observadas entre essas as espécies de bactérias comparadas. Estudos futuros serão necessários para confirmar a expressão e funcionalidade dos produtos gênicos preditos.

A partir das seqüências únicas obtidas por RDA, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e testados usando como molde os DNAs genômicos de *B. elkanii* e *B. japonicum*. Foram obtidas ampliações somente com o DNA de *B. elkanii*, indicando a presença das seqüências somente no DNA *tester* e sua ausência no DNA *driver*. Estes oligonucleotídeos iniciadores serão muito úteis na caracterização de novos isolados de bradirrizóbios e também para verificar a aquisição de DNA através de transferência gênica horizontal entre os bradirrizóbios analisados.

## 6. Referências Bibliográficas

Alberton O, Kaschuk G e Hungria M (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* 38:1298–1307.

Andrade DS, Murphy PJ e Giller KE (2002) Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian oxisol. *Soil Biol Biochem* 34:477-485.

Arber W (2000) Genetic variation: molecular mechanism and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* 24:1-7.

Barcellos FG, Menna P, Batista JSS e Hungria M (2007) Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. *Appl Environ Microbiol* 73(8):2635–2643.

Barcellos FG, Batista JSS, Menna P e Hungria M (2009) Genetic differences between *Bradyrhizobium japonicum* variant strains contrasting in N<sub>2</sub>-fixation efficiency revealed by representational difference analysis. *Arch Microbiol* 191:113-122.

Barrett CF e Parker MA (2006) Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp nodule bacteria on two *Mimosa* spp. *Appl Environ Microbiol* 72:1198–1206.

Boddey LH e Hungria M (1997) Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biol Fertil Soils* 25:407–415.

Buchanan B, Gruissem W e Jones RL (2000) *Biochemistry e molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1367 pp.

Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004) *Manual de adubação e*

calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10ª edição. Porto Alegre, 400 pp.

Campo RJ e Hungria M (2004) Economical and environmental benefits of inoculation and biological nitrogen fixation with the soybean: Situation in South America. In: Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja. Foz do Iguassu, PR, Brasil.

Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M e Vandamme P (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1729–1735.

Curz F e Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* 8:128-133.

Felske A (2002) Streamlined representational differences analysis for comprehensive studies of numerous genomes. *J Microbiol Methods* 50:305-311.

FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (1999) Culture Collection Catalogue. 8ª edição, FEPAGRO, Porto Alegre.

Ferreira MC e Hungria M (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Res* 79:139–152.

Freire JRJ (1977) Inoculation of soybean. In: Vincent JM, Whitney AS e Bose J (eds) *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. University of Hawaii, Honolulu, pp 335-379.

Galli-Terasawa LV, Glienke-Blanco C e Hungria M (2003) Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a cerrados soil. *World J Microbiol Biotechnol* 19: 933–939.

Giongo A, Ambrosini A, Freire JRJ, Bodanese-Zanettini MH e Passaglia LMP (2007)

Amplification of 16S rDNA gene sequences to differentiate two highly related bradyrhizobia species. *Pesq agropec bras* 42:1361-1364.

Giongo A, Ambrosini A, Vargas LK, Freire JRJ, Bodanese-Zanettini MH e Passaglia LMP (2008) Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. *Appl Soil Ecol* 38:261–269.

Guo H , Sun S, Finan TM e Xu J (2005) Novel DNA sequences from natural strains of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* (71)11:7130–7138.

Hollestelle A e Schutte M (2005) Representational difference analysis as a tool in the search for new tumor suppressor genes. *Methods Mol Med* 103:143-59.

Hungria M, Campo RJ e Mendes IC (2001) Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Embrapa Soja: Circular Técnica 35; Embrapa Cerrados: Circular Técnica 13, Londrina, 48 pp.

Hungria M, Chueire LMO, Megias M, Lamrabet Y, Probanza A, Guttierrez-Manero FJ e Campo RJ (2006) Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant Soil* 288: 343–356.

Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136-139.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, *et al.* (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9:225-256.

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE e Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can J Microbiol 38:501-505.

Kuykendall LD, Young JM, Martinez-Romero E, Kerr A e Sawada H (2005) *Rhizobium*. Bergey's Manual. Volume Two. The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Springer, New York, pp 325-340.

Lafay B e Burdon JJ (1998) Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. Appl Environ Microbiol 64:3989–3997.

Lancashire JF, Turni C, Blackall PJ e Jennings MP (2007) Rapid and efficient screening of a representational difference analysis library using reverse southern hybridisation: Identification of genetic differences between *Haemophilus parasuis* isolates. J Microbiol Methods (68)2:326-30.

Lisitsyn NA, Lisitsyn N e Wigler M (1993) Cloning the differences between genomes. Science 259: 946-951.

Loureiro MF, Kaschuk G, Alberton O e Hungria M (2006) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols of the state of Mato Grosso under various soil, cropping and inoculation managements. Biol Fert Soils 43:665-674.

Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN e Martinez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. Syst Appl Microbiol 29:315–332.

Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, Xi CW, Luyten E e Vanderleyden J (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. Microb Ecol 26:193-205.

Minamisawa K (1990) Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. Plant Cell Physiol

31:81-89.

Minamisawa K, Seki T, Onodera S, Kubota M e Asami T (1992) Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Appl Environ Microbiol* 58:2832–2839.

Minamisawa K, Itakura M, Suzuki M, Ichige K, Isawa T, Yuhashi K e Mitsui H (2002) Horizontal Transfer of Nodulation Genes in Soils and Microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. Elkanii*. *Microbes Environ* 17(2):82-90).

Moulin L, Munive A, Dreyfus B e Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948–950.

Peres JRR (1979) Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Peres JRR e Vidor C (1980) Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em estirpes de soja. *Agron Sulriograndense* 16: 205-219.

Perret X, Staehelin C e Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180-201.

Rivas R, Willems A, Subba-Rao N, Mateos PF, Dazzo FB, Martinez-Molina E, Gillis M e Velazquez E (2003) Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol* 26:47–53.

Rumjanek NG, Berkum P e Triplett EW (1993) Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl Environ Microbiol* 59:4371-4373.

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H e Martínez-Romero E (2002) Advances in



*Rhizobium* research. Crit Rev Plant Sci 21:323-378.

Somasegaram P e Hoben JH (1994) Handbook for rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, New York, 450 pp.

Stanley J, Brown GG e Verma DP (1985) Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. J Bacteriol 163:148-154.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, De Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C e Dreyfus B (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J Bacteriol 183:214–220.

Tinsley C e Nassif X (1996) Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoea*: Two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. Proc Natl Acad Sci 93:11109-11114.

Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martinez-Molina E e Velazquez E (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl Environ Microbiol 71:1318–1327.

Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Gillis M, Mateos PF, Martinez-Molina E, Igual JM e Willems A (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int J Syst Evol Microbiol 55:1985–1989.

Vásquez-Arroyo J, Sessitsch A, Martínez E e Peña-Cabriaes JJ (1998) Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil 204:147-154.

Willems A (2007) The taxonomy of rhizobia: An overview. In: Velazquez E e Rodríguez-Barrueco C (eds) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer, pp 3–14.

Willems A, Fernandez-Lopez M, Munoz-Adelantado E, Goris J, DeVos P, Martinez-Romero E, Toro N e Gillis M (2003) Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. Int J Syst Evol Microbiol 53:1207–1217.

Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J e Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. Int J Syst Bacteriol 45:706-711.

### **Fontes da Internet**

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola,

[http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200901\\_5.shtm](http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200901_5.shtm) (fevereiro de 2009)