

DEDICO

A quem mais poderia dedicar esta tese se não àquela que se tornou, ao longo desses anos, a pessoa mais importante da minha vida. Mariangela, obrigada por me fazer melhor como ser humano, como mulher e como cientista. Nunca me sentirei merecedora do grande privilégio de estar ao seu lado, mas humildemente agradeço aos “céus” por um “anjo da guarda” tão real. Dedico a você, assim como dediquei, um dia, a minha querida mãe, um pouco do que a poesia brasileira têm de mais rico:

Rosa

*Tu és divina e graciosa, estátua majestosa, do amor
Por Deus esculpurada e formada com o ardor
Da alma da mais linda flor, de mais ativo olor
Que na vida é preferida pelo beija-flor.
Se Deus, me fora tão clemente, aqui neste ambiente
De luz formada numa tela, deslumbrante e bela
O teu coração, junto ao meu, lanceado, pregado
E crucificado sobre a rósea cruz do arfante peito teu.
Tu és a forma ideal, estátua magistral
Oh ! alma perenal do meu primeiro amor, sublime amor
Tu és, de Deus a soberana flor
Tu és , de Deus a criação, que em todo o coração
Sepultas o amor, o riso, a fé e a dor em sândalos olentes
Cheios de sabor, em vozes tão dolentes como um sonho em flor
És Láctea estrela , és mãe da realeza.
És tudo enfim que tem de belo
Em todo resplendor da santa natureza (...)*

(Pichinguiha)

AGRADEÇO

Ao Departamento de Pós-Graduação em Genética da UFPR por oferecer um curso de alto nível e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de buscar novos horizontes para meus conhecimentos científicos. Agradeço em especial as Professoras Dras. Margarete e Chirlei pela atenção dedicada ao curso e a formação de seus alunos. Agradeço também a amiga Marli que me auxiliou nas questões burocráticas mas sempre com uma palavra amiga de conforto e paciência.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida, à Embrapa soja por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários e amigos desta empresa pela colaboração e apoio recebido. Em especial ao querido Ademir pelas referências bibliográficas e a Dra. Marisa por ter me incentivado nos momentos difíceis.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação, em especial ao professor Dr. João e a professora Dra. Marina pela compreensão diante de minhas limitações. Agradeço a professora Dra. Ligia por colaborar para a realização da minha disciplina de docência.

Aos queridos membros da banca: Dras. Ligia, Berenice, Chirlei e Marina e, Drs. Galdino e Fernando, pela paciência diante de todos os percalços neste final de tese. Quero registrar aqui minha eterna gratidão, pois sei que todos exercitaram sua compreensão e paciência afim de contribuir com o sucesso deste trabalho. Sei que a perfeição não foi atingida mas confesso ter dado o melhor de mim neste momento.

Aos meus colegas do laboratório dedido este trabalho com todo o carinho. Nenhuma palavra pode resumir o meu eterno agradecimento. Divido esta vitória com os amigos: Ligia, que sempre me amparou nas dúvidas estando ao meu lado nos momentos de perda. As amigas Pâmela e Fabiana pelas correções dos resultados, pela disponibilidade em ajudar e pelo profissionalismo com que assumiram essa empreitada em busca do meu doutorado. Aos amigos Fabinho e Alan, sempre apostos no bionumeric para auxiliar nos detalhes dos dendrogramas. Em especial ao amigo Fábio por me aturar diante das dúvidas, sejam elas profissionais ou não, obrigado pela segurança em poder contar contigo nas horas de desespero diante do computador. A amiga Jesi, de quem tive a oportunidade de me aproximar nos últimos tempos e quem revisou minhas referências para que eu ganhasse tempo nas últimas correções. Agradeço a amiga Lilian, pelas suas palavras de otimismo,

pelo seu bom humor e pela sua rara capacidade de elogiar as pessoas. Ao amigo Fernando agradeço pelas eternas discussões diante das dificuldades em otimizar as técnicas, mas agradeço mesmo as suas palavras de fé e confiança. Ao amigo Rinaldo por sua presença constante nos trabalhos em casa de vegetação. Agradeço a amiga Maria por me fazer compreender que as dificuldades não são maiores do que nossa capacidade de superá-las. Também agradeço o apoio: do Leandro, nos relaxamentos; da amiga Daisy e Eliane, pela calma transmitida; da Eriana pelas risadas com sotaque especial e; dos amigos Rodriguinho, Michele, Adrian, Mirian, Lucas.

Agradeço também aos antigos amigos do laboratório, que mesmo distantes, sempre estiveram em meu coração: Magda, Osvaldino, Ulisses, Luciano, Fernanda, Juninho, Everson, Manezinho, Taila. Em especial um grande abraço a amiga Dra. Marisa pela grande amizade, pelas trocas de informações e por me fazer acreditar na integridade do verdadeiro cientista. Quero deixar também um abraço especial aos estagiários de outros laboratórios que sempre dividiram comigo suas alegrias e angústias: Lizandra, minha conterrânea, de quem me orgulho muito; Angélica, Tati e Rose.

Agradeço pela amizade e carinho dos amigos Sabine, Silmar, Sonia e Lia com quem dividi meus trabalhos disciplinares e minhas horas de almoço no dia a dia da aulas. Obrigado por me ouvirem nas horas de solidão e agonia.

Aos amigos do Flamenco agradeço os momentos de prazer e felicidade dividindo comigo minha paixão pela arte andaluz. Um beijo grande ao meu professor Michel Cássin, de quem me orgulho e a quem agradeço por me fazer parte dessa grande família. Agradeço aos amigos Marlon, Glauber, André e Marcelo por estarem ao meu lado, mesmo sabendo que nem sempre estava certa. A amiga Flávia meu eterno agradecimento pela oportunidade de começar minha carreira acadêmica e de me oferecer a chance de acreditar que é no caminho da docência que devo seguir. Aos amigos Carol e Gui que, infelizmente pelo sofrimento, me ajudaram a reencontrar a minha fé e o meu amor próprio. A todas as bailarinas que passaram a acreditar no nosso grupo de oração como uma forma de ajudarmos uns aos outros.

Agradeço pela eterna presença dos velhos amigos: Iris, Liciania, Celiana, Carla, Ana Paula, Elaine, Silvia, Liliane, Marcio, Roberta, Andreia, Marcia, Abadia, Rony, Paulo, Flávio, Marcio pediatra, Licurgo. Em especial ao meu grande amigo Rodrigo, que mesmo diante das minhas falhas como parceira, nunca me abandonou e sempre prezou pelo contato. Obrigada por me fazer confiar na sua eterna amizade, obrigada por sempre ter acreditado no meu potencial. Um beijo especial a amiga Melissa que hoje sem encontra

distante, mas feliz por ter encontrado sua verdadeira pátria e a amiga Gisele em quem eu confio e com quem divido minhas angústias mais íntimas, mas também minhas verdades mais imperfeitas. Ao amigo Ed que hoje é mais que um amigo, que ajudou a mim e a minha família a superar um dos momentos mais difíceis que já passamos.

Aos amigos da bioética, com quem dividi o grande prazer de enveredar pelos conhecimentos da filosofia: Ogle, Mack, Fabi, Lauana, Alda, Lázara, Tânia. Em especial a professora Dra. Olivia por acreditar na minha capacidade de escrita e por lutar ao meu lado em busca de novas conquistas. Ao professor Dr. José Eduardo pelo convite em dividir comigo o mérito de estar ao seu lado na edição do primeiro livro em que participo. Espero que essa nova empreitada nos guie em busca de uma ciência mais justa e igualitária.

A minha querida amiga e companheira Glaciela, por quem já tinha grande apreço e que, devido as circunstâncias da vida, pude estreitar meus laços de amizade e admiração. Obrigada por tudo o que fez por mim, obrigada por me despertar todas as manhãs me lembrando da importância do meu compromisso. Obrigada por se preocupar comigo e por estar ao meu lado mesmo conhecendo muitos de meus defeitos e limitações.

Agradeço em especial ao meu irmão João Carlos por ter apostado na minha especialização em bioética e por me incentivar neste novo caminho em busca de mim mesma e, a minha irmã Terezinha, pelo seu eterno papel maternal salvando-me naquelas horas que somente uma mãe poderia participar. Um forte abraço aos meus queridos sobrinhos Betinho e Romeu e aos meus novos sobrinhos Felipe, Flávia e Murilo. Também sou grata pela torcida dos meus cunhados Betão, Denise, Irene, Fernando, Cássia, Joni. Um agradecimento especial vai para a D. Neusa, por sua preocupação, seu carinho e dedicação em melhorar minha qualidade de vida.

Ao meu companheiro Bays peço desculpas pelos sucessivos rompantes diante das dificuldades. Agradeço sua calma, seu carinho, seu amor e sua dedicação. Obrigada por sempre acreditar em mim, pelo orgulho com que fala de meus feitos e por nunca podar minha incessante participação em várias atividades sociais, negligenciando, muitas vezes, minha presença em sua vida. Aos meus gatinhos Lolo e Lilo pelo amor incondicional.

Finalmente ofereço aos meus pais não só este trabalho, mais tudo o que tenho de melhor, pois são nas minhas melhores qualidades que vejo a presença constante dos valores que me ensinaram durante toda a vida.”Mãe e Pai, eu amo muito vocês, sou grata por quem sou e por tudo o que me tornei. Sou grata pelas minhas conquistas e pela oportunidade que me deram para que eu buscasse o conhecimento como forma de conquistar meus sonhos e de me tornar uma verdadeira cidadã. Sinto a falta de vocês, de

saber que mesmo que eu queira não posso mais encontrá-los para dar-lhes um abraço. Mas uma ponta de felicidade aparece, ainda timidamente, quando percebo que agora, finalmente, posso ser eu mesma diante dos seus olhos”.

“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça pelo amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do senhor por longos dias.”

SALMO 23.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Isolados de nódulos do feijoeiro provenientes de solos dos Cerrados do Distrito Federal obtidos e utilizados neste estudo. Nas coleções de culturas da Embrapa Soja e Embrapa Cerrados esses isolados receberam a denominação “H”.....60
- TABELA 2. Características dos tipos de vegetação dos Cerrados.....61
- TABELA 3. Origem das 43 estirpes de feijoeiro obtidas de solos de Pernambuco e do Paraná e classificadas como *Rhizobium etli* no estudo de Grange & Hungria (2004)¹.....63
- TABELA 4. Estirpes utilizadas como referência nos estudos de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro.....64
- TABELA 5. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) e posicionamento em grande grupos (GG) na análise de rep-PCR de isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.....79
- TABELA 6. Distribuição dos isolados dos Cerrados, provenientes de áreas cultivadas ou não cultivadas anteriormente, segundo a distribuição em grandes grupos (GG) no dendrograma obtido na análise dos produtos de BOX-PCR.....83
- TABELA 7. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de lipopolissacarídeos, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos.....85
- TABELA 8. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de BOX-PCR, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos.....85
- TABELA 9. Coeficientes de similaridade, não ajustados e ajustados, entre as populações de microssimbiontes do feijoeiro isolados de áreas dos Cerrados sob três manejos distintos: não cultivadas, cultivadas com leguminosas mas não com feijoeiro e cultivadas com não leguminosas.....87
- TABELA 10. Nodulação (número, NN e massa de nódulos secos, MNS), biomassa de planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e N total acumulado na parte aérea (NTPA) de feijoeiro, cultivar Carioca, inoculado com 93 isolados de áreas cultivadas e não cultivadas

dos Cerrados¹. Ensaio conduzido em condições axênicas de casa de vegetação, cada estirpe foi inoculada individualmente, com três repetições e as plantas foram coletadas no florescimento.....90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo do nitrogênio: O nitrogênio atmosférico é reduzido e incorporado aos compostos orgânicos dos seres vivos. Além da fixação biológica, os principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio são os da amonificação, nitrificação e desnitrificação (Fonte: Manyani et al., 2001). 25

FIGURA 2. Sinais específicos entre o *R. tropici*, por exemplo, e sua leguminosa hospedeira. *pSym*, plasmídeo simbiótico, gene da nodulação; proteína Nod; proteína reguladora NodD UDP-GlcNAc, precursor do esqueleto oligossacarídico da molécula sinal (Fonte: Manyani et al., 2001).

FIGURA 3. Pêlo radicular sendo infectado por *Rhizobium* (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

FIGURA 4. Formação dos bacteróides (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

FIGURA 5. Nódulos de raiz infectados (Fonte: Hungria, 1994b).

FIGURA 6. Simbiose estabelecida. À esquerda: nódulos de raiz; à direita: planta infectada e não infectada (Hungria, 1994b).

FIGURA 7. Rota biossintética da estrutura básica de um fator de nodulação. (Fonte: Downie, 1998)

FIGURA 8. Distribuição geográfica da Região dos Cerrados. (Fonte: Mostasso et al., 2002).

FIGURA 9. Perfis de lipopolissacarídeos encontrados em 93 isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.

FIGURA 10. Dendrograma construído com 73 isolados dos Cerrados e com estirpes utilizadas como referência, obtido pela análise de agrupamento dos produtos de amplificação da reação por BOX-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

FIGURA 11. Dendrograma construído utilizando o algoritmo UPGMA e as seqüências alinhadas do gene 16S rRNA de 45 estirpes microssimbiontes do feijoeiro isoladas de solos dos Cerrados e de estirpes utilizadas como referência

FIGURA 12. Produtos de PCR correspondentes ao gene *nodA* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 13. Produtos de PCR correspondentes ao gene *nodB* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 14. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodC* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 15. Produtos de PCR correspondents ao gene *nifH* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 16. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodA* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J)

FIGURA 17. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodB* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 18. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 19. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB* e *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 20. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região do *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 21. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

RESUMO

Depois da água, o nitrogênio (N) é o principal elemento nutricional limitante para a produção vegetal nos diferentes ecossistemas. O fertilizante nitrogenado se tornou então, um produto essencial para o manejo de culturas comerciais mas de alto custo, dificultando o acesso por parte de pequenos produtores, como é o caso dos plantadores de feijão. Neste contexto, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) representa uma alternativa para satisfazer a demanda deste importante nutriente, tanto para ecossistemas agrícolas como para naturais. Conhecer todos os fatores implicados na manutenção desta prática se torna de suma importância, pois, além de colaborar para uma agricultura sustentável, auxilia nas investigações a cerca da diversidade de espécies que podem representar a veracidade das características da microbiota dos solos brasileiros. Nesta investigação foram conduzidos dois estudos de caracterização genética bacteriana. No primeiro, quatro avaliações foram aplicadas (perfil de lipopolissacaródeo-LPS, análise de agrupamento dos produtos obtidos por *rep*-PCR, sequenciamento do gene ribossomal 16S e capacidade de nodulação e fixação de N₂) em 93 isolados para analisar a diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro sob distintos manejos de solo (áreas cultivada com leguminosas, áreas cultivadas sem leguminosas e áreas de solo coberto com vegetação natural) em 20 diferentes áreas dos Cerrados. Neste trabalho foi possível verificar, através do cálculo dos índices de diversidade e riqueza genética, que a diversidade genética bacteriana dos solos dos Cerrados em equilíbrio altera rapidamente em função das práticas de manejo de solo. Pelo sequenciamento de 16S rRNA, foi confirmado que bactérias pertencentes à subclasse beta são capazes de nodular o feijoeiro, pois diversas estirpes apresentaram maior similaridade de bases com o gênero *Burkholderia*. Portanto, este estudo demonstrou que o uso do solo nos Cerrados promoveu mudanças quantitativas e qualitativas na diversidade de bactérias capazes de nodular e fixar N₂ com o feijoeiro. No segundo estudo conduzido por esta investigação, bactérias classificadas em *Rhizobium etli* por sequenciamento do 16S rRNA, foram comparadas pela análise de RFLP-PCR dos genes de nodulação e fixação. Uma análise polifásica também foi construída com os resultados obtidos para cada gene digerido com seis diferentes enzimas (*Msp* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Hha* I, *Nde* III e *Mbo* II). Pela análise de RFLP-PCR dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH* foi possível verificar que as estirpes brasileiras de *R. etli* sempre formaram um grupo distinto, ainda que com variabilidade intra-específica. Na análise polifásica incluindo os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*, os grupos referentes às diferentes espécies foram evidenciados. As estirpes de *R. tropici* e *Rhizobium* sp. formaram um agrupamento bastante heterogêneo, com um nível final de similaridade de apenas 40,7%. As estirpes brasileiras de *R. etli* foram agrupadas com 64,1% de similaridade e *R. etli* CFN 42 se uniu a esse grupo em 53,7%. Já o grupo de *R. etli* isolado da Espanha foi bastante distinto. Os resultados indicam que a população estabelecida nos solos de Cerrados foi caracterizada pela diversidade elevada quanto às propriedades fisiológicas, simbióticas e genéticas e que; os *R. etli* brasileiros precisam ser mais profundamente avaliados, pois pode representar uma nova sub-espécie num futuro próximo.

Palavras-chave: Feijoeiro, Diversidade, *Rhizobium etli*, *Burkholderia*, Cerrados, FBN, evolução, população.

ABSTRACT

Water is the most limiting factor in agriculture, usually followed by nitrogen (N). N-fertilizer has thus become essential for the management of commercial crops, but its high cost often implicates in a low usage by small farmers, as those growing common bean (*Phaseolus vulgaris*). In this context, biological nitrogen fixation (BNF) represents an alternative source to supply N at a low cost. However, the maximization of BNF depends on short, medium and long-time research, and studies aiming at increasing the knowledge about the community of microsymbionts in the soils fit into this last category. The main objective of this work was to perform two studies aiming at the characterization of rhizobia associated with the common bean crop in Brazilian soils. In the first study, the diversity of 93 common bean microsymbionts from the Cerrados soils was evaluated using four methodologies: profiles of lipopolysaccharides (LPS), DNA amplification by *rep*-PCR (polymerase chain reaction) with the BOX “primer”, sequencing of bases of the ribosomal 16S gene and capacity of nodulation and BNF. Common bean plants were used to trap the isolates from ten areas covered with natural vegetation, from five areas cropped with non-legumes and from five areas growing legumes, but none with bean. The sequencing analysis indicated that bacteria belonging to the genus *Burkholderia* are capable of nodulating beans and in this study they represented the majority of the isolates in undisturbed areas, while rhizobia predominated in cropped areas. Using the BNF process as a model, a high level of diversity was shown in all areas, however, diversity and richness indices drastically decreased with crop introduction, particularly when growing legumes. Contrarily, cropping resulted in a fast selection of microsymbionts with higher capacity of BNF, especially in the presence of legumes. Three important points were highlighted in this study: 1) a need of maintaining undisturbed areas to preserve the biodiversity of the Cerrados; 2) that when the ecosystem equilibrium is broken there is an immediate process of selection and adaptation of the bacteria aiming at, within the potential of the community, the crop sustainability; 3) that biodiversity is not necessarily associated with the sustainability of commercial crops. In the second study, nodulation (*nodA*, *nodB* e *nodC*) and N₂ fixation (*nifH*) genes of Brazilian strains of *Rhizobium etli* were analysed by RFLP (restriction fragment length polymorphism)-PCR with six restriction enzymes. The Brazilian strains of *R. etli* were clustered in a group isolated from other bean rhizobia species, but with high intra-species variability. The group of Brazilian strains showed higher similarity, although at low levels, with type-strain CFN 42 from Mexico, being considerably different from *R. etli* from Spanish soils. A hypothesis was proposed that *R. etli* was introduced in Brazil via seeds from indigenous populations of Mesoamerica, before European colonization. Later, *R. tropici* was introduced via migration from center-south Andes and due to its higher adaptability to the environmental conditions in Brazil it has become the preferential symbiont of common bean; however, *R. etli* persists in Brazilian soils.

Key-words: Bacteria evolution, Biodiversity, Biological nitrogen fixation, *Burkholderia*, Cerrados, Common bean, *Rhizobium etli*, *Phaseolus vulgaris*.