



## Evidências Polifásicas Suportam a Reclassificação de *Bradyrhizobium japonicum* tipo Ia em uma Nova Espécie

**Jakeline Renata Marçon Delamuta<sup>(1)</sup>; Renan Augusto Ribeiro<sup>(2)</sup>; Itamar Soares de Melo<sup>(3)</sup>; Mariangela Hungria<sup>(4)</sup>**

<sup>(1)</sup> Doutoranda; Bolsista CAPES; Programa de Pós-Graduação em Microbiologia/CCB; Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, PR; jake\_renata@hotmail.com; <sup>(2)</sup> Assistente; Laboratório de Biotecnologia do Solo; Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, CEP 86001-970, Londrina, PR; ribeiro@cnpsa.embrapa.br; <sup>(3)</sup> Pesquisador; Embrapa Meio Ambiente; Rodovia SP 340, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP; itamar@cnpsa.embrapa.br; <sup>(4)</sup> Pesquisadora; Embrapa Soja; hungria@cnpsa.embrapa.br

**RESUMO** – O gênero *Bradyrhizobium* compreende um grupo diverso de bactérias com capacidade de estabelecer simbiose com plantas da família Leguminosae. Espécies de *B. japonicum* são divididas em dois grupos bem definidos (tipo I e Ia) e fortes evidências sugerem que eles representam espécies distintas. Com o objetivo de apontar as diferenças entre esses dois grupos, foram utilizadas quatro estirpes do tipo Ia em uma análise polifásica. O *fingerprinting* obtido por BOX-PCR demonstrou a grande semelhança dentro do grupo de *B. japonicum* tipo Ia, com valores acima de 85% de similaridade entre eles. Resultado análogo também foi constatado pela análise dos genes *housekeeping* concatenados. Dados de hibridização DNA-DNA mostram que o valor obtido entre a estirpe referência de *B. japonicum* tipo Ia e a estirpe tipo de *B. japonicum* tipo I é de 65% e de 63% com a estirpe tipo de *B. betae*. Esses resultados apontam a necessidade de um estudo de taxonomia polifásica mais aprofundado e levamos a sugerir, futuramente, a reclassificação de *B. japonicum* tipo Ia como uma nova espécie, de acordo com as normas do Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP).

**Palavras-chave:** taxonomia polifásica, diversidade genética, *Bradyrhizobium*.

**INTRODUÇÃO** - Plantas da família Leguminosae ocupam uma ampla variedade de biomas terrestres, com algumas delas estabelecendo simbiose com um grupo de bactérias coletivamente chamadas de rizóbios, cuja característica mais importante é a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>). No caso do Brasil, bactérias do gênero *Bradyrhizobium* representam a grande maioria dos isolados de leguminosas tropicais nativas, além de apresentarem relevância econômica como simbioses de culturas de importância econômica, como é o caso da soja.

Estudos com *Bradyrhizobium japonicum* têm demonstrado uma elevada diversidade genética entre as estirpes, o que resultou na subdivisão em dois grupos distintos designados como tipo I e tipo Ia (Hollis et al., 1981).

Foram realizadas análises de taxonomia polifásica, incluindo caracterização morfo-fisiológica, genética por *rep*-PCR e hibridização DNA-DNA e filogenética por MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), o objetivo do estudo foi evidenciar a diferença genética, fenotípica e filogenética entre esses dois grupos dentro da espécie *B. japonicum*.

**MATERIAL E MÉTODOS** - A extração do DNA total das estirpes analisadas (SEMIA 566, 5060, 5079, 5080 e 6059, USDA 110, *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, *B. betae* LMG 21987<sup>T</sup>, *B. canariense* BTA-1<sup>T</sup> e *B. yuanmingense* CCBAU 10071<sup>T</sup>) foi realizada de acordo com Kaschuk et al. (2006). A caracterização genética por *rep*-PCR foi realizada com o *primer* BOX-A1R conforme descrito por Pinto et al. (2007) e seis genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*) foram utilizados na análise filogenética por MLSA, utilizando-se parâmetros pré-definidos, modelo de distância K2P e algoritmo de Neighbor-Joining. O suporte estatístico foi avaliado pela análise de *bootstrap*, com 1.000 repetições. A análise fenotípica foi realizada através da caracterização morfo-fisiológica das estirpes, onde foram analisadas a capacidade de utilização de 49 fontes distintas de carbono, crescimento em meio de cultura LB (Luria-Bertani) (Ribeiro et al., 2012) e o perfil de ácidos graxos das estirpes.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** - O *fingerprinting* obtido pela reação de BOX-PCR revelou um grupo de quatro estirpes de *B. japonicum* tipo Ia, demonstrando claramente a alta similaridade entre elas. Este grupo ficou evidentemente separado da estirpe tipo de *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (tipo I), bem como das demais espécies (Figura 1).

Além da filogenia do gene 16S rRNA (dados não mostrados), a técnica de MLSA foi empregada para avaliar a relação entre as estirpes do grupo Ia e os taxa relacionados. Na árvore filogenética dos genes concatenados (Figura 2), as estirpes do tipo Ia formaram um grupo coeso, com *bootstrap* de 100%, sendo este grupo relacionado com *B. betae*, *B. japonicum* e *B.*

*canariense*.

Dados de hibridização DNA-DNA (Hollis et al. 1981; Rivas et al., 2004) mostram que *B. japonicum* USDA 110 (tipo Ia) e *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (tipo I) compartilham 65% de similaridade do genoma total (Tabela 1), valor este abaixo do limite (70% de similaridade) necessário para se considerar duas estirpes como sendo da mesma espécie. O conteúdo G-C também difere entre elas (64% para USDA 110 e 62.8% para *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>) (Rivas et al., 2004).

A avaliação morfo-fisiológica das estirpes incluiu inoculação em meio LB, porém nenhuma das estirpes do grupo Ia nem as demais espécies apresentaram crescimento. O perfil de ácidos graxos das estirpes tipo Ia e I também foi avaliado e dividiu-as em dois grupos distintos, A e B, assim como a utilização de fontes de carbono também apontou diferenças entre elas (Tabela 2).

Uma espécie bacteriana agrupa estirpes genomicamente semelhantes, que compartilham um elevado grau de similaridade em várias características independentes (Rosselló-Mora e Amann, 2001). Além dos dados de literatura, todas as estirpes do tipo Ia apresentaram similaridade nos dados fenotípicos e genotípicos e foram diferentes de *B. japonicum* tipo I, indicando que estes dois grupos possuem características muito distintas para serem classificados como membros de uma única espécie, porém mais análises estão sendo realizadas para suportar tal afirmação.

**CONCLUSÕES** - As características morfo-fisiológicas, genéticas e filogenéticas analisadas indicam fortemente que as estirpes de *B. japonicum* do tipo Ia são membros de uma nova espécie.

## REFERÊNCIAS

HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E.; ELKAN, G.H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *rhizobiaceae*. *J Gen Microbiol*, 123: 215-222, 1981.

ISLAM, M.S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada*

*koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 1416-1429, 2008.

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

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem*, 39: 1851-1864, 2007.

RIBEIRO, R.A.; ROGEL, M.A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F.G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microb*, 62: 1179-1184, 2012.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *Int J Syst Evol Microb*, 54: 1271-1275, 2004.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25: 39-67, 2001.

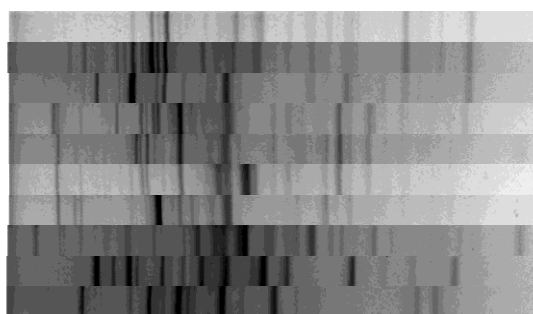
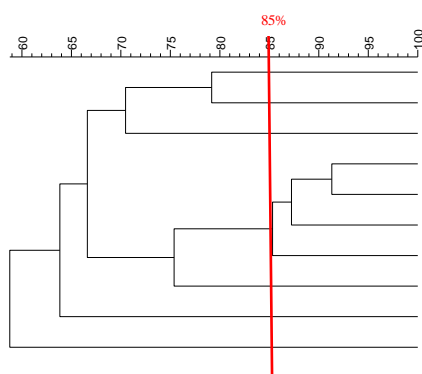
VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microb*, 55: 569-575, 2005.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microb*, 52: 2219-2230, 2002.

Jaccard (Tol 3.0%-3.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

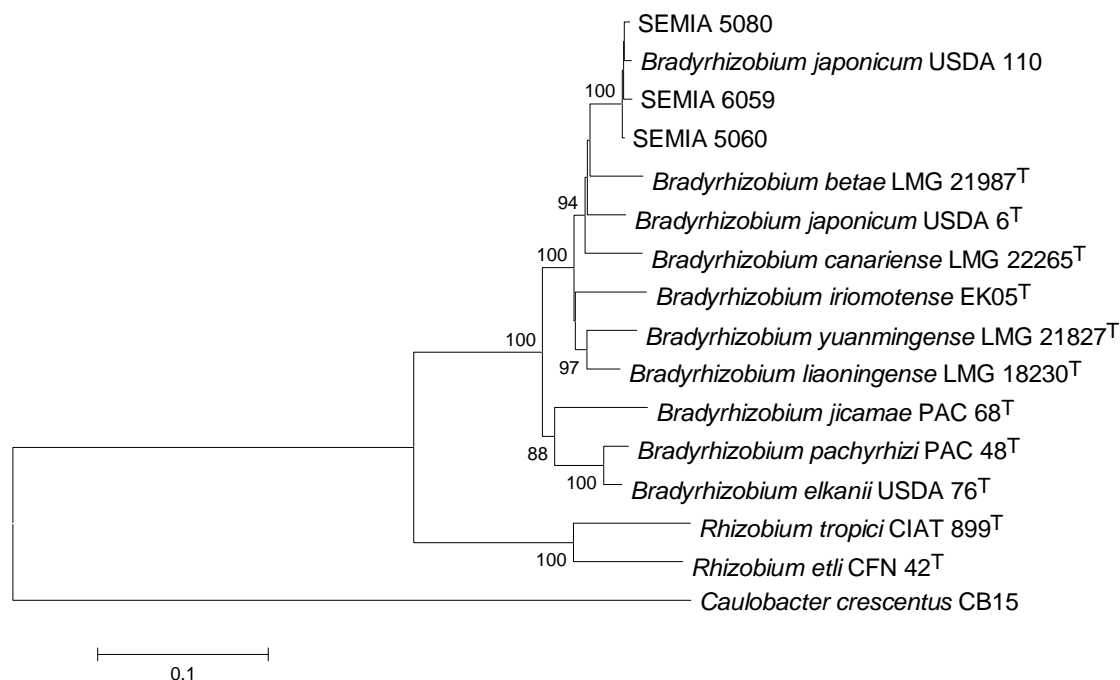
Box

Box



SEMIA 566	
SEMIA5079	tipo I
USDA6	
SEMIA6059	tipo Ia
USDA110	
SEMIA5060	
SEMIA5080	
B. BETAE	
B. CANARIENSE	
B. YUANMINGENSE	

**Figura 1** - Dendrograma de similaridade demonstrando a relação entre *B. japonicum* tipo I e Ia, baseado no *fingerprinting* de BOX-PCR



**Figura 2** - Relações filogenéticas entre as estirpes de *B. japonicum* tipo Ia e as estirpes tipo de *Bradyrhizobium* com base nos genes *housekeeping* concatenados (*atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*)

**Tabela 1** – Hibridização DNA-DNA entre *B. japonicum* tipo Ia e outras espécies do gênero *Bradyrhizobium* mais intimamente relacionadas

	<i>B. japonicum</i> tipo I	<i>B. betae</i>	<i>B. canariense</i>	<i>B. iriomotense</i>	<i>B. liaoningense</i>	<i>B. yuanmingense</i>
<i>B. japonicum</i> USDA 110 tipo Ia	65%*	63%*	30+/-7%#	37% <sup>^</sup>	61%*	45.2% <sup>+</sup>

\*Rivas et al. (2004); +Yao et al. (2002); # Vinuesa et al. (2005); <sup>^</sup>Islam et al. (2008)

**Tabela 2** – Crescimento das estirpes em diferentes fontes de carboidrato e em meio de cultura LB

+ com crescimento; - ausência de crescimento; w crescimento fraco

Características	SEMIA 5060 (tipo Ia)	SEMIA 5080 (tipo Ia)	SEMIA 6059 (tipo Ia)	USDA 110 (tipo Ia)	<i>B. japonicum</i> (tipo I)	<i>B. betae</i>	<i>B. canariense</i>	<i>B. yuanmingense</i>
Utilização como fonte de carbono:								
Glicerol	w	+	w	w	w	w	w	w
D-Arabinose	+	+	+	+	w	+	+	w
L-Arabinose	w	+	w	w	+	+	w	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	w	+	w	w	w	w	w	+
L-Xilose	+	+	+	+	w	+	+	+
D-Adonitol	-	w	w	-	-	-	w	-
Metil-βD-Xilopiranosido	w	w	w	w	w	-	w	w
L-Ramnose	w	w	w	w	w	w	+	w
D-Manitol	w	w	w	w	w	-	w	w
D-Sorbitol	w	w	w	w	w	-	w	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	+	+	-
D-Arabitól	w	w	w	w	w	-	w	w
2-Cetogluconato de potássio	-	-	-	-	-	+	-	-
Crescimento em:								
LB	-	-	-	-	-	-	-	-