



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Diversidade e filogenia de estirpes de *Rhizobium* pela metodologia de MLSA

Rebeca Fuzinatto Dall'Agnol⁽¹⁾; Jakeline Renata Marçon Delamuta⁽²⁾; Renan Augusto Ribeiro⁽³⁾; Mariangela Hungria⁽⁴⁾

- (1) Mestranda em Biotecnologia; Departamento de Bioquímica e Biotecnologia; Universidade Estadual de Londrina - UEL; Rodovia Celso Garcia Cid – Campus Universitário, CEP: 86051-990, Londrina, PR; rebeca.fd@hotmail.com; (2) Doutoranda em Microbiologia; Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL; Rodovia Celso Garcia Cid – Campus Universitário, CEP: 86051-990, Londrina, PR; jake_renata@hotmail.com; (3) Assistente, Laboratório de Biotecnologia dos Solos, Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, CEP: 86001-970, Londrina, PR, renanribeiro83@hotmail.com; (4) Pesquisadora, Laboratório de Biotecnologia do Solo, Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, CEP: 86001-970, Londrina, PR, hungria@cnpso.embrapa.br

RESUMO – O nitrogênio (N) é um dos elementos mais requisitados pelas culturas, sendo um fator determinante na produtividade agrícola. Sabe-se que o grupo de bactérias conhecidas como rizóbios pode fixar o N₂ atmosférico, suprimindo total ou parcialmente a carência do mesmo no solo. Dessa forma, a caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é importante para futuros estudos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade filogenética de cinco estirpes de *Rhizobium*, que apresentam fortes indicações de representarem novas espécies por estudos filogenéticos anteriores. Todas as estirpes foram crescidas em meio de cultura específico e submetidas à análise por MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*) e BOX-PCR. Os resultados de ambas análises agruparam as estirpes em *clusters* separados das demais espécies do gênero, reforçando a hipótese de que tais bactérias podem representar uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium*.

Palavras-chave: análise filogenética, MLSA, housekeeping, rizóbios.

INTRODUÇÃO - O nitrogênio (N) é um dos elementos mais requisitados pelas culturas, sendo sua disponibilidade no solo um fator determinante na produtividade agrícola. Devido ao manejo intensivo e inadequado do solo, tanto o N quanto outros nutrientes são perdidos, diminuindo a sustentabilidade dos sistemas de produção. Sabe-se que o grupo de bactérias conhecidas como rizóbios podem suprir total ou parcialmente a demanda de N, devido à sua habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico, transformando-o em formas assimiláveis pelo vegetal (Hungria *et al.*, 1994). Dessa forma, a caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é importante para a recomendação de estirpes que serão utilizadas como inoculantes nos sistemas de produção agrícola (Ribeiro *et al.*, 2009; Delamuta *et al.*, 2011).

Um dos métodos utilizados para a discriminação de espécies consiste no sequenciamento do gene ribossomal

16S, considerado marcador filogenético universal para procariontes devido ao seu alto grau de conservação. Alterações nestas sequências indicariam taxas de evolução em níveis diferenciados (Lloret & Esperança, 2005). No entanto, constatou-se que a análise filogenética com base unicamente no gene 16S pode resultar em dados incongruentes, uma vez que a alta conservação das sequências nucleotídicas pode não permitir diferenciar estirpes de espécies distintas; além disso, podem ocorrer eventos de transferência horizontal, que resultariam em sequências mosaicas, dificultando a análise (Martens *et al.*, 2007).

Grças ao advento de técnicas cada vez mais elaboradas de análises de sequências gênicas, a taxonomia procariótica evoluiu de forma notável, permitindo a descoberta e a reclassificação de espécies, ou complementando dados de espécies já existentes (Klenk & Goker, 2010). Dentre essas novas técnicas, destaca-se a metodologia por MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*), que consiste na análise conjunta de múltiplos genes do metabolismo basal (genes *housekeeping*), os quais apresentem taxa de evolução mais rápida que os genes ribossomais, mas com nível de conservação suficientemente alto para manter as informações evolutivas (Gevers *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009). Dessa maneira, a análise por MLSA permitiria elucidar a distinção entre espécies altamente relacionadas, que não seriam esclarecidas apenas com o gene RNAr 16S, e a análise conjunta dos genes *housekeeping* funcionaria como um “tampão” contra os efeitos de recombinação genética ou transferência horizontal.

Outras metodologias empregadas na caracterização de espécies consistem na obtenção de perfis de DNA por amplificação de regiões repetitivas do genoma – DNA *fingerprinting*. Dentre elas, a análise por BOX-PCR tem mostrado vantagens, como a utilização de um único *primer* e um maior número de bandas formadas.

Este trabalho tem por objetivo a caracterização da diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de

Rhizobium que apresentam indicações de representarem novas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS - Foram utilizadas cinco estirpes *Rhizobium*, simbiontes do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*), e que foram agrupadas separadamente de outros representantes deste gênero em estudos filogenéticos anteriores (Pinto *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). As estirpes e suas origens correspondem a: CPAO 1135, de Dourados, MS; PRF 35 e PRF 54, de Pitanga, PR; H52 e H53, de Planaltina, GO. As culturas foram crescidas em meio de cultura específico (YMA, extrato-de-levedura e manitol) e o DNA foi extraído de acordo com Menna *et al.* (2006). Todas as estirpes foram submetidas à PCR e sequenciamento, utilizando-se o gene ribossomal 16S e os genes *housekeeping recA* (proteína de recombinação RecA), *gyrB* (DNA girase, subunidade beta) e *glnII* (glutamina sintetase). Os perfis de DNA foram obtidos utilizando-se o primer BOX-AR1 e analisados no programa Bionumerics, vs 4.6.

Análise estatística

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram reunidas em *contigs* com auxílio dos programas Phred, Phrap e Consede, analisadas individualmente. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4.0 com modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining e o suporte estatístico foi avaliado pela análise de bootstrap com 1.000 repetições. Os perfis de DNA obtidos por BOX-PCR foram analisados pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, versão 4.6), com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e a tolerância no programa estabelecida em 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - A árvore filogenética construída com base nas sequências do DNAr 16S agrupou próximas quatro das cinco estirpes analisadas. Apenas a estirpe CPAO 1135 foi alocada separadamente das demais, ficando mais próxima de *Rhizobium tropici* (Fig. 1). Apesar de amplamente utilizada para caracterização de espécies, nota-se que a análise com base unicamente no gene ribossomal 16S não define claramente a posição das estirpes, conforme já constatado por outros autores (Ribeiro *et al.*, 2009; Delamuta *et al.*, 2011). Já na análise com base nos genes *housekeeping* concatenados, observa-se um único *cluster* formado para as cinco estirpes, com um suporte *bootstrap* de 100% (Fig. 2). Tais resultados indicam de que essas estirpes possam representar uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium*. Os resultados apresentados pela análise dos perfis de DNA por BOX-PCR reforçam ainda mais essas evidências. Na árvore de similaridade apresentada na Figura 3 observa-se que as cinco estirpes estudadas neste trabalho agrupam-se juntas novamente, estando PRF 35, CPAO 1135 e H 52 com 100% de similaridade entre si, 95% de similaridade com H53e 80% de similaridade com PRF 54. Levando em conta que espécies diferentes apresentam menos que 70% de

similaridade em perfis de BOX, os resultados deste *fingerprinting* corroboram os obtidos por MLSA, reforçando a hipótese de que essas estirpes possam representar uma nova espécie.

CONCLUSÕES – Os resultados de MLSA e BOX-PCR das estirpes de *Rhizobium* analisadas neste trabalho apresentaram fortes indicações de que as mesmas podem representar uma nova espécie.

REFERÊNCIAS

- DELAMUTA, J.R.K.; RIBEIRO, R.A.; MENNA, P. BANGEL, E.V. HUNGRIA, M. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, in press, 2011.
- GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 3, p. 733-739, 2005.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2, 9-89, 1994
- KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.175-182, 2010.
- LLORET, L.; ROMERO, E.M. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista latinoamericana de Microbiología**, v.47, p.43-60, 2005.
- MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; De VOS, P.; GILLIS, M.; WILLENS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.57, p. 489-503, 2007.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-32, 2006.
- PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, n.8, p.1851-1864, 2007.
- RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multi Locus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.
- RIVAS, R. GARCÍA-FRAILE, P; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. **Microbiology Insights**, v.2, p.51-69, 2009.

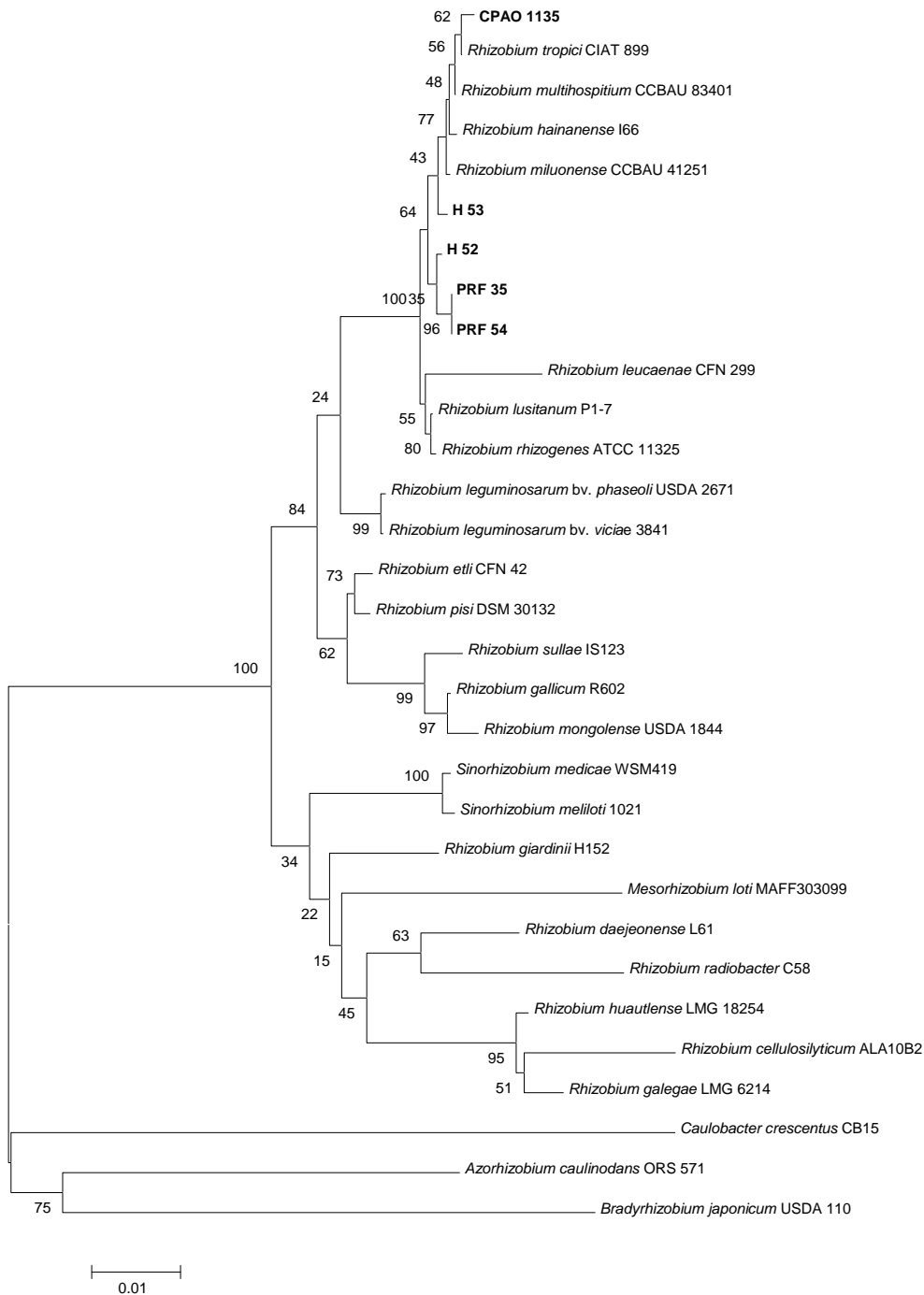


Figura 1 – Árvore filogenética baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com bootstrap de 1000 repetições.

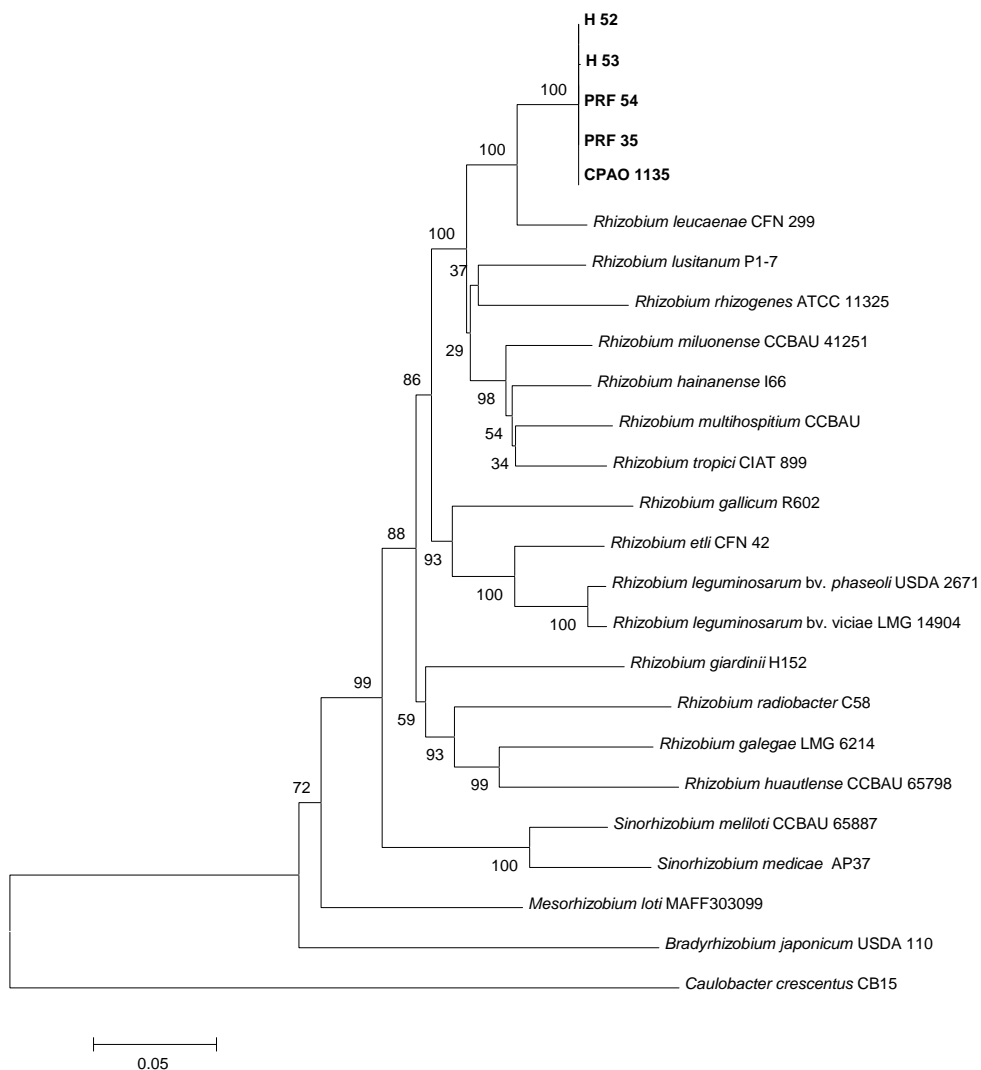


Figura 2 – Árvore filogenética baseada no sequenciamento dos genes *housekeeping glnII*, *gyrB* e *recA*. *Caulobacter crescentus* foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com bootstrap de 1000 repetições.

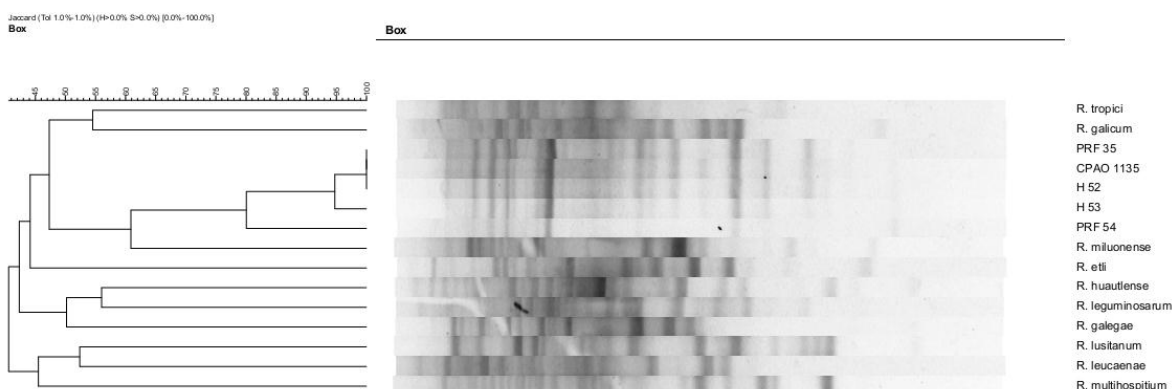


Figura 3 – Dendrograma baseado no *fingerprinting* pela metodologia de BOX-PCR. Os clusters foram obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6). Para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.