

Utilização da técnica de MLSA em estudos taxonômicos e filogenéticos com *Bradyrhizobium* e sua importância na descrição de novas espécies.

Delamuta, J.R.M.^{1*}, Ribeiro, R.A.², Hungria, M.²

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia; Universidade Estadual de Londrina, Bolsista CAPES.

² Laboratório de Biotecnologia do Solo, Embrapa Soja, Londrina. Bolsistas CNPq.

* jake_renata@hotmail.com

RESUMO

A metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) tem sido cada vez mais utilizada como ferramenta para se inferir a taxonomia, a filogenia e a evolução de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, conhecidas como rizóbios. Como exemplo, o emprego do MLSA foi decisivo para a recente descrição da nova espécie *Bradyrhizobium diazoefficiens* por nosso grupo de pesquisa (Delamuta *et al.*, 2013). Neste estudo, utilizando-se a sequência concatenada dos genes *atpD*, *glnII* e *recA*, as relações filogenéticas de 13 estirpes de *Bradyrhizobium* foram determinadas e os resultados indicam a existência de possíveis novas espécies dentro do gênero.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre taxonomia, diversidade e evolução de procariotos, incluindo rizóbios, têm como base técnicas polifásicas, incluindo dados fenotípicos e genotípicos (Zhang *et al.*, 2012). Na última década, a análise de genes *housekeeping* utilizando a técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) tem sido empregada com sucesso em estudos sobre as relações taxonômicas e filogenéticas entre rizóbios, mostrando-se como uma ferramenta poderosa para a descrição de novas espécies (Delamuta *et al.*, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

Treze estirpes de *Bradyrhizobium* foram escolhidas de estudos anteriores (Delamuta *et al.*, 2012; Menna *et al.*, 2009). Além da sequência do gene ribossomal 16S, três genes *housekeeping* (*atpD*, *glnII*, e *recA*) foram utilizados na análise filogenética por MLSA, usando-se parâmetros pré-definidos, com o modelo de distância Tamura-Nei e o algoritmo de Neighbor-Joining. O suporte estatístico foi avaliado pela análise de *bootstrap*, com 1.000 repetições.

RESULTADOS

A árvore construída com o gene 16S RNAr dividiu as estirpes de *Bradyrhizobium* em dois grandes grupos (Figura 1A), com o primeiro (G-I) reunindo oito estirpes SEMIAs e as estirpes tipo do grupo *B. japonicum* e o segundo grupo (G-II) incluindo as SEMIAs 6154, 6028, 6053, 6148 e 6145 e a estirpe tipo de *B. elkani*. Na Fig. 1A também fica evidenciado que a posição taxonômica das estirpes não ficou claramente definida com base apenas no gene 16S RNAr.

Para uma análise taxonômica mais refinada das estirpes, as sequências dos genes *atpD*, *glnII* e *recA* foram concatenadas (Figura 1B). Com base no MLSA, a SEMIA 656 foi agrupada com *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, o par de estirpes 6002-6144 agrupou com *B. arachidis* CCBAU 051107^T e as SEMIAs 6028, 6053 e 6145 mostraram uma maior similaridade com *B. pachyrhizi* PAC 48^T. Interessantemente, sete estirpes ocuparam posições isoladas na árvore.

DISCUSSÃO

O gênero *Bradyrhizobium* é considerado ancestral de todos os rizóbios e tem sido isolado de várias leguminosas (Lloret et al., 2005). Contudo, apesar de sua posição evolutiva, poucas espécies estão atualmente descritas no gênero. Uma possível explicação para isso é que a taxonomia moderna é baseada no gene 16S RNAr, cuja sequência é extremamente conservada nesse gênero. Nesse contexto, a técnica de MLSA está se mostrando cada vez mais útil nos estudos filogenéticos e uma prova disto é a sua utilização, nos últimos anos, na descrição e/ou reclassificação de novas espécies de *Bradyrhizobium* (Guerrouj et al., 2013; Wang et al., 2013), inclusive com a recente descrição de *B. diazoefficiens* (Delamuta et al., 2013). Os resultados deste estudo indicam que as sete estirpes que ocuparam posições isoladas na árvore concatenada provavelmente representam novas espécies e confirmam que esta técnica é importante e eficaz para revelar a diversidade ainda pouco explorada dentro do gênero *Bradyrhizobium* e, certamente, de outras espécies fixadoras de nitrogênio de importância econômica e ambiental.

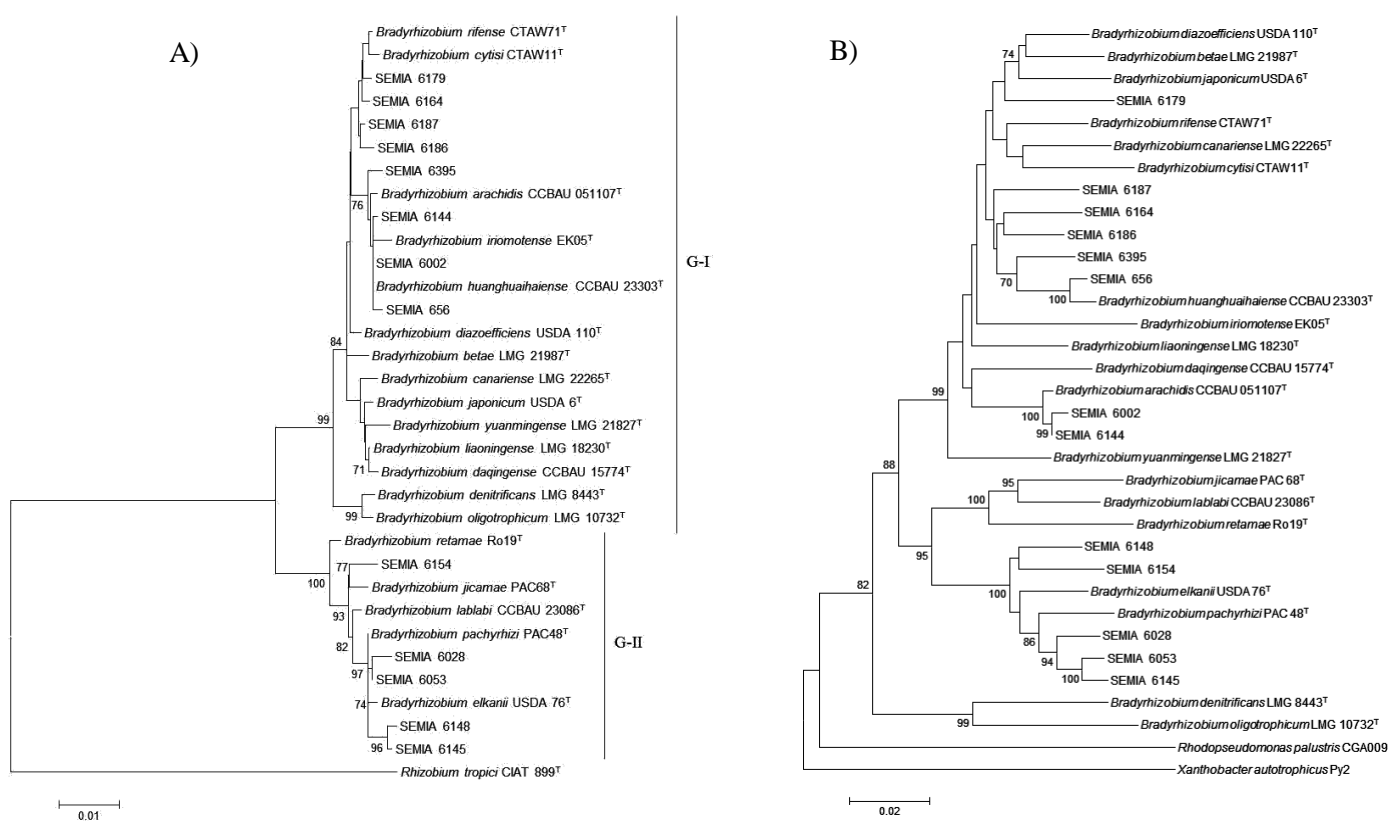


Figura 1. Relações filogenéticas entre as estirpes de *Bradyrhizobium* deste estudo e as estirpes tipo com base no (A) gene 16S RNAr e (B) nos genes *housekeeping* concatenados (*atpD*, *glnII*, e *recA*).

REFERÊNCIAS

- Delamuta, J.R.M., et al. (2012). *Braz. J. Microbiol.* 43: 698-710.
 Delamuta, J.R.M., et al. (2013). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (online).
 Guerrouj, K., et al. (2013). *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 218-223.
 Lloret, L., et al. (2005). *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47: 43-60.
 Menna, P., et al. (2009). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2934-2950.
 Wang, J.Y., et al. (2013). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 616-624.
 Zhang, Y.M., et al. (2012). *PLoS ONE* 7(9): e44936. doi:10.1371.