

Filogenia dos Genes *gltA* e *glnII* como Suporte para a Classificação de Espécies no Gênero *Rhizobium*

RIBEIRO, R.A.^{1,2}; BARCELLOS, F.G.¹; HUNGRIA, M.¹;
¹Embrapa Soja, Londrina, Caixa Postal 231, CEP 86001-970; ²Universidade Estadual de Londrina, PR, e-mail: renanribeiro83@hotmail.com

Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é originário das Américas e os grãos dessa leguminosa representam uma fonte importante de proteína, principalmente para a população mais pobre na América Latina [6, 8].

No Brasil, a falta de tecnologia e o cultivo em solos marginais, devido ao baixo retorno econômico da cultura, contribuem para a queda na produtividade do feijoeiro e, nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), podem proporcionar o aumento na produtividade. O N necessário para a cultura pode ser obtido de três formas: diretamente do solo, por meio do uso de fertilizantes nitrogenados ou pela fixação biológica de nitrogênio (FBN). O processo de FBN ocorre pela simbiose com bactérias denominadas rizóbios, as quais são atualmente utilizadas como inoculantes.

A classificação atual dos rizóbios é definida como: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alfaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; e distribuídos nas famílias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hiphomicrobiaceae* [3]. A classe *Alfaproteobacteria* é dividida em sete gêneros: *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, classificados a partir da análise do gene ribossomal 16S, sendo observada uma maior relação entre os três últimos gêneros [10].

Inicialmente, os rizóbios que nodulam o feijoeiro foram classificados em uma única espécie, *R. phaseoli* que, em 1984, passou a ser denominada como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. [7]. Contudo, havia indicação de subdivisão em dois grupos, denominados tipo I e tipo II, com base em características fisiológicas e genéticas. Desse modo, em 1991 Martinez-Romero e colaboradores definiram as estirpes do grupo II como uma nova espécie, *R. tropici*, subdividida em tipo IIA e IIB, e que tiveram as estirpes CFN 299 e CIAT 899, respectivamente, determinadas como estirpes padrão [12]. Dois anos depois, por meio de análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S RNAr, foi sugerido que alguns rizóbios isolados em solos americanos e inicialmente classificados como pertencentes ao tipo I, fossem reclassificados em uma nova espécie, *Rhizobium etli*, a qual possui a estirpe CFN 42 como padrão [15]. Essa nova espécie, junto com a espécie de *R. leguminosarum*, pertencente ao grupo I, possui uma alta correlação, tanto para alguns genes simbióticos como para algumas regiões cromossômicas, indicando a possibilidade de ter ocorrido uma transferência do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum* [6]. Finalmente, em 1997 duas novas espécies de microssimbiontes do feijoeiro foram descritas, *R. gallicum* e *R. giardinii* [1]. Desse modo, existem hoje cinco espécies descritas como microssimbiontes do feijoeiro: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* [7], *R. tropici* [12], *R. etli* [15], *R. gallicum* e *R. giardinii* [1]. Todas essas espécies, exceto *R. gallicum*, já foram detectadas em solos brasileiros [5, 13, 14].

Atualmente, a filogenia do gênero *Rhizobium*, assim como ocorre em outros procariotos, é baseada no gene ribossomal 16S [3, 18], embora vários estudos tenham demonstrado que esse gene pode, ocasionalmente, sofrer transferência horizontal e recombinação genética, resultando em sequências mosaicas [11]. Essas observações implicam que a análise filogenética bacteriana, com base exclusivamente no DNA ribossomal 16S, pode nem sempre refletir de modo preciso a filogenia dos procariotos. Com o objetivo de minimizar esses efeitos, foi proposta a técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), que utiliza mais de um *locus* gênico, resultando em uma análise mais precisa, e com isso surge a importância da busca de novos genes que possam ser utilizados como mar-

cadores filogenéticos. Um estudo recente com o gênero *Sinorhizobium*, realizado por Martens et al. [11], demonstrou que a técnica de MLSA, utilizando cinco genes conservados (*housekeeping*), foi mais apropriada para a classificação de bactérias desse gênero quando comparada à análise exclusivamente com o gene ribossomal 16S. Zeigler [17], inclusive, sugeriu que a análise de menos de cinco genes já seria suficiente para uma classificação confiável.

Com o objetivo de obter marcadores filogenéticos alternativos em estudos de filogenia e taxonomia dentro do gênero *Rhizobium*, foram analisados os genes conservados *glnII* e *gltA* e comparados aos resultados obtidos com o gene ribossomal 16S.

Para este trabalho foram utilizadas 16 estirpes isoladas de solos brasileiros e previamente identificadas como pertencentes ao grupo de *Rhizobium tropici* tipo A, *R. tropici* tipo B (identificadas como muito eficazes na fixação de nitrogênio) e *R. etli.*, todas provenientes da “Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” do laboratório de Biotecnologia de Solo da Embrapa Soja. Foram utilizadas também as estirpes-tipo das espécies descritas como microssimbiontes do feijoeiro.

A extração de DNA das estirpes foi realizada conforme já descrito [2] e para a amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), foram utilizados dois genes housekeeping: *gltA* (citrato sintetase) e *recA* (recombinase A), além do gene 16S. As amplificações foram conduzidas conforme descrito por Martens et.al. [11]. O resultado da amplificação foi verificado pela visualização dos fragmentos, sob radiação UV, em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR foram purificados com o kit “QIAquick” (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de Sanger, com o uso do kit “DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (GE Healthcare). Os primers utilizados para as reações de PCR foram os descritos anteriormente para as reações de PCR. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas phredPhrap versão 0,990722 (1993-2000) e examinadas manualmente.

Finalmente, foi realizado alinhamento múltiplo das sequências com o uso do programa ClustalX versão 1.83 e a partir disso foram construídas três árvores filogenéticas separadamente, uma para cada um dos três genes. As árvores filogenéticas foram geradas com o uso do programa MEGA versão 3.1 [9]. Para a construção das árvores foram realizadas as análises de “Neighbor joining” (NJ), utilizando o método de Kimura-2 para cálculo de distância e suporte estatístico considerando um valor de *bootstrap* com 1000 repetições.

Os tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR utilizados para a análise foram: 1410 pb para o gene 16S, 602 pb para o gene *gltA* e 415 pb para o gene *recA*. Todos os genes utilizados foram discriminantes para as estirpes utilizadas.

Para a construção das árvores filogenéticas, com os três genes analisados, foram utilizadas as sequências de 16 estirpes, além de uma outra estirpe de *Caulobacter crescentus* utilizada como outgroup. Um grupo com as estirpes de *R. tropici* tipo A e B, incluindo as estirpes padrões, foi formado com altos valores de *bootstrap* (84 % a 100 %) para todos os 3 genes, confirmando a alta relação genética desses organismos, embora algumas estirpes apresentassem, conforme o gene analisado, posições diferentes dentro dos subgrupos. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Pinto et. al. [14], em que foi encontrada essa mesma relação entre essas estirpes microssimbiontes de feijoeiro, por meio de análise de PCR-RFLP e seqüenciamento do gene ribossomal 16S.

Quatro estirpes denominadas como *R. etli* (estirpes 72, 74, 206 e 209) foram analisadas anteriormente por Grange & Hungria [5], por ERIC-PCR, seguida por RFLP-PCR e seqüenciamento parcial do gene ribossomal 16S. Para as estirpes 72, 74 e 209 foram encontrados resultados congruentes, como agrupamento, em todas as árvores analisadas, com um alto valor de *bootstrap* (99 % a 100 %), embora elas não tenham sido agrupadas com a estirpe padrão da espécie (CFN 42) e, também, com nenhuma outra estirpe-padrão. O mesmo ocorreu com a estirpe 206, que não obteve correlação significativa com nenhuma estirpe-padrão de

Rhizobium e com nenhuma outra estirpe estudada, sugerindo que estas estirpes possam pertencer a uma outra espécie de *Rhizobium*.

Além disso, este trabalho ajudou a corroborar os resultados obtidos por Gaunt et al. [4] e Zakhia & Lajudie [16], que também encontraram uma alta relação entre as estirpes de *R. etli* e *R. leguminosarium*, em que essas duas estirpes agrupadas apresentaram valores de *bootstrap* de 90 % a 100 %.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que os dois genes utilizados neste trabalho podem ser utilizados com confiança para estudos de filogenia e taxonomia dentro do gênero *Rhizobium*, pois demonstraram resultados congruentes quando comparados com o gene ribossomal 16S.

Referências

- [1] AMARGER, N., MACHERET, V., IAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 47, p. 996–1006, 2007.
- [2] Fernandes, M.F., Fernandes R.P.M., Hungria, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, p. 911-920, 2003.
- [3] GARRITY, G.M., HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology. 2 ed., Baltimore: The Willians & Wilkins, p. 119-154, 2001.
- [4] Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., Young, J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, p. 2037-2048, 2001.
- [5] GRANGE, L., HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. Soil Biology & Biochemistry, v. 36, p. 1389-1398, 2004.

- [6] HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., GUTIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 21, p. 1515–1528, 2000.
- [7] JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore : Williams & Wilkins, p. 235-244, 1984.
- [8] 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. *Soil & Tillage Research*, v. 32, p. 210-220, 2006.
- [9] KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.
- [10] Lloret, L., Romero, E.M. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista latinoamericana de Microbiología*, v. 47, p. 43-60, 2005.
- [11] Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., Vos, de P., Gillis, M., Willems, A. **Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa**. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 57, p. 489-503, 2007.
- [12] Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 41, p. 417-426, 1991.
- [13] Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, v. 73, p. 121-132, 2002.
- [14] PINTO, F.G.S., Hungria, 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, p. 1851-1864, 2007.

[15] Segovia, L., Martinez-Romero, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarium* biovar *phaseoli* type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 43, p. 374-377, 1993.

[16] ZAKHIA, F., LAJUDIE, de P. Taxonomy of rhizobia. Agronomie, v. 25, p. 569-576, 2001.

[17] Zeigler, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 53, p. 1893-1900, 2003.

[18] WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, v. 173, p. 697-703, 1991.