

Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do *16S rRNA*

Bethânia Figueiredo Barbosa de Toledo⁽¹⁾, Jackson Marcondes⁽¹⁾
e Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Tecnologia, Rodovia Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: bebarbosa@bol.com.br, jackson@fcav.unesp.br, egerle@fcav.unesp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi confrontar as seqüências parciais do gene *16S rRNA* de estirpes padrão de rizóbios com as de estirpes recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil, com vistas à verificação da confiabilidade do sequenciamento parcial desse gene para a identificação rápida de estirpes. Foram realizados sequenciamentos através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores relativos à região codificadora do gene *16S rRNA* entre as bactérias estudadas. Os resultados foram analisados pela consulta de similaridade de nucleotídeos aos do “Basic Local Alignment Search Tool” (Blastn) e por meio da interpretação de árvores filogenéticas geradas usando ferramentas de bioinformática. A classificação taxonômica das estirpes *Semia* recomendadas para inoculação de leguminosas com base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira não foi confirmada em todas as estirpes. A maioria das estirpes estudadas, consultadas no Blastn, é consistente com a classificação proposta pela construção de árvores filogenéticas das seqüências destas estirpes, com base na similaridade pelo sequenciamento parcial do gene considerado.

Termos para indexação: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, filogenia.

Characterization of rhizobia indicated for inoculant production using *16S rRNA* partial sequencing

Abstract – The aim of this work was to compare the partial sequences of *16S rRNA* gene of rhizobia strain patterns already classified with strains recommended for the production of inoculants in Brazil, in order to verify the reliability of partial sequencing of the gene for the purpose of rapid identification of strains. Polymerase Chain Reaction (PCR) sequencing using primers on the coding region of the *16S rRNA* gene among the bacteria studied was conducted. The results were analyzed by consulting the nucleotides' similarity based on Basic Local Alignment Search Tool (Blastn) and by interpreting the phylogenetic trees generated by bioinformatic tools. The taxonomic classification of *Semia* strains recommended for legume inoculation based on morphological properties and host specificity was not confirmed in all strains. The similarity of the Blastn consultation by partial sequencing of the gene found in strains studied is consistent with the classification proposed by the construction of a phylogenetic tree of sequences of strains in most cases.

Index terms: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, phylogeny.

Introdução

A inoculação de bactérias diazotróficas simbióticas em algumas leguminosas de importância agrônômica dispensa a aplicação de adubos nitrogenados nos solos, o que reduz o custo de produção, e provê equilíbrio ambiental. Contudo, a indicação de uma estirpe de rizóbio como inoculante comercial requer estudos que permitam avaliar seu potencial para estabelecer a associação, fixar simbioticamente o nitrogênio e competir com outras bactérias nativas no solo.

Existem coleções de estirpes isoladas e recomendadas, porém muitas ainda requerem uma classificação sistemática adicional que permita um agrupamento e uma diferenciação mais apropriada, além de novas identificações, que possibilite uma recomendação adequada do uso dessas estirpes bacterianas.

No Brasil, a recomendação de estirpes de rizóbios ficou a cargo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse

Agrícola (Relare). A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro) tem a atribuição de manter uma coleção e preservar e distribuir as estirpes para as indústrias. Essa coleção é reconhecida internacionalmente, porém ainda faltam estudos e informações taxonômicas sobre as estirpes, com base em métodos moleculares aceitos atualmente. As estirpes da coleção da Fepagro são classificadas como *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp., *R. fredii* ou *R. loti*, com base no grupo de inoculação cruzada, no crescimento rápido ou lento e na reação ácida ou alcalina em meio de cultura que contém manitol como fonte de carbono (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 1999).

Nas análises que consideram o gene *16S rRNA*, os rizóbios (alfaproteobactérias da ordem Rhizobiales), classificados inicialmente apenas na família Rhizobiaceae, foram classificados nas famílias Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Ensifer*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*) e Hyphomicrobiaceae (*Azorhizobium*) (Garrity & Holt, 2001). São descritas 54 espécies até o momento, das quais 23 são representantes do gênero *Rhizobium* (inclusive as bactérias do antigo gênero *Agrobacterium* e *Allorhizobium*), 11 do gênero *Ensifer*, uma do gênero *Sinorhizobium*, 11 do gênero *Mesorhizobium*, seis do gênero *Bradyrhizobium* e duas do gênero *Azorhizobium* (Garrity et al., 2007).

A caracterização de estirpes da coleção, que considera genes conservados e simbióticos, é essencial para comparar e identificar os rizóbios nativos dos solos brasileiros e para entender as relações entre planta e simbiote. Essa classificação pode ser realizada com marcadores moleculares. O produto do gene *16S rRNA* é o principal componente da subunidade ribossômica menor dos procariotos (Brosius et al., 1978), constituída por moléculas de ácido ribonucleico e proteínas, a qual é parte do maquinário celular responsável pela síntese proteica. Assim, esse gene está presente em todas as bactérias, apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicador de como os microrganismos estiveram relacionados durante a evolução ao longo de milhões de anos (Olsen & Woese, 1993). Ferramentas que possibilitem a identificação de estirpes de maneira rápida, segura e com baixo custo são de extrema importância.

O objetivo deste trabalho foi confrontar as sequências parciais do gene *16S rRNA* de estirpes padrão de rizóbios com as de estirpes recomendadas para a produção

de inoculantes no Brasil, com vistas à verificação da confiabilidade de sequenciamento parcial desse gene para a identificação rápida de estirpes.

Material e Métodos

Os organismos utilizados neste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se no padrão de biossegurança NB-1. As estirpes padrão utilizadas foram obtidas no Laboratorium voor Microbiologie da Universiteit Gent (Bélgica) e no Laboratoire de Microbiologie de Soils do Institut Scientifique de Recherche Agronomique (INRA, França). As estirpes Semia (Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul) foram obtidas na Fepagro. Todas foram cultivadas e mantidas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

As estirpes foram cultivadas e mantidas em meio “yeast manitol agar” (YMA) (Vincent, 1970), com vermelho-congo, em estufa BOD, a 28°C. Foram posteriormente transferidas repetidamente (três vezes) para meio “triptone-yeast medium” (TY) (Beringer, 1974) sólido, com a finalidade de diminuir a produção de exopolissacarídeos, e, então, cultivadas durante 48 horas a 28°C sob agitação de 180 rpm em meio de cultivo TY líquido. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 12.000 g, por 30 min, a 4°C. O sedimento foi lavado com NaCl 0,85%, para a remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. A suspensão foi novamente centrifugada para a obtenção das células, que foram utilizadas para a extração do DNA.

A extração do DNA genômico das bactérias seguiu o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989). Nos cálculos da concentração do DNA, considerou-se que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por mililitro de solução (Sambrook et al., 1989) e, na confirmação da concentração, foi realizada comparação da intensidade das bandas de pGEM com concentrações conhecidas, por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Na amplificação da sequência conservada do gene *16S rRNA*, foram utilizados iniciadores universais pA “forward” 5’ –AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG– 3’, localização em *E. coli*: bases 8 a 27, e p5B “reverse” 5’–

TAC CTT GTT ACG ACTT-3', localização em *E. coli*: bases 1507 a 1492 (Wilson et al., 1990), o que resultou em fragmentos de seqüências de aproximadamente 1,5 kb. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizaram tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, contendo 50 mM KCl, 200 µM de cada deoxinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmols de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 50 ng de DNA, água Milli-Q (Millipore) previamente filtrada para um volume final de 50 µL. As amostras foram colocadas em um termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc., EUA), para amplificação do gene, com o programa: 2 min a 94°C; 30 ciclos de 50°C por 30 s, 72°C por 60 s, 94°C por 30 s; 5 min a 72°C.

Os produtos da PCR foram purificados usando a enzima ExoSAP-IT (USB) antes do sequenciamento. Para tal, foram adicionados 2 µL da enzima a 5 µL do produto de PCR, que foram mantidos a 37°C por 15 min para degradar o excesso de iniciadores e nucleotídeos da reação. As amostras foram posteriormente mantidas a 80°C por 15 min, para a inativação da enzima ExoSAP-IT (USB). As amplificações por PCR para sequenciamento dos fragmentos do gene *16S rRNA* previamente obtidos foram realizadas em microplacas usando os iniciadores pA-F e pc5B-R de forma independente. Foram utilizados: 0,4 µL de "DNA sequencing" (Big Dye Terminator Cycle Sequencing – Ready ABI Prism, versão 3); 3,2 pmols do iniciador (ora pA-F, ora pc5B-R); 100 ng do amplicom molde; 4,6 µL de tampão (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM de MgCl₂); e água Milli-Q para um volume final de 10 µL. Para a precipitação, foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% às amostras, que foram agitadas ligeiramente e, após 15 min em repouso, à temperatura ambiente, foram centrifugadas a 3.220 g por 45 min, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e a placa deixada por 5 min em temperatura ambiente, invertida, sobre papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70% e a microplaca foi submetida à centrifugação a 3.220 g por 10 min, a 20°C. Então, o sobrenadante foi novamente dispensado e a placa novamente invertida sobre papel absorvente e submetida a uma breve centrifugação. As amostras foram secas em fluxo laminar, por 30 min. A desnaturação foi realizada com formamida Hi-Di (P/N 4311320, Applied Biosystems, EUA), a 95°C,

por 5 min, seguida pelo sequenciamento no ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

A verificação da qualidade das seqüências geradas foi realizada pelo programa Sequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems), que gerou arquivos com o eletroforetograma de cada seqüência. Esses eletroforetogramas foram inicialmente analisados com o auxílio dos programas Phred (Ewing et al., 1998), Phrap e Consed (Gordon et al., 1998), e os arquivos foram analisados pelo programa "practical extraction and reporting language" (Perl – linguagem prática para extração e relatórios) desenvolvido no laboratório, e aqueles que tiveram as seqüências com menos de 100 nucleotídeos com qualidade inferior a 20 foram descartados, para permitir maior confiabilidade nos resultados. Em seguida, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa Blastn ("Basic Local Alignment Search Tool") (Altschul et al., 1997), para comparação com seqüências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As seqüências alinhadas e o consenso foram visualizados e analisados no editor de seqüências Consed (Gordon et al., 1998). Esse alinhamento foi feito pelo programa Clustalx v.1.81 (Thompson et al., 1997) com base no gene *16S rRNA*, com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros, usando os seguintes parâmetros: "Pairwise Alignment" (Gap Opening 10.00, Gap Extension 0.10), "Multiple Alignment" (Gap Opening 10.00, Gap Extension 0.10). Para matriz de distância das árvores filogenéticas, foi utilizado o algoritmo Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969) e o método "neighbor-joining" de construção de filogramas, que foram processados pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular Mega3 (Kumar et al., 2004) aplicando um "bootstrap" de 1.000 vezes para inferência estatística. Para efeito de comparação com as árvores filogenéticas, obtidas a partir das seqüências das estirpes estudadas, foram construídas também árvores filogenéticas, tanto pela direção "forward" quanto pela direção "reverse", com seqüências obtidas do GenBank de estirpes que tiveram a região que codifica o gene *16S rRNA* sequenciada por completo.

Resultados e Discussão

A qualidade do sequenciamento dos produtos de PCR purificados, tanto no sentido "forward" como

no “reverse”, foi adequada e produziu sequências de 200 a 600 pb. O resumo dos relatórios obtidos do Blastn encontra-se na Tabela 1. A disponibilidade de numerosas sequências de nucleotídeos derivadas dos genes *16S rRNA*, depositadas em bancos de dados públicos, ampliou e facilitou a identificação de bactérias diazotróficas. A qualidade das sequências utilizadas neste trabalho foi amplamente assegurada, ainda que as sequências fossem parciais. Por terem sido feitas algumas repetições, foram utilizados os programas Phrap e Consed, para a avaliação da qualidade por meio da obtenção de sequências-consenso.

A maior parte das sequências das estirpes padrão e das estirpes recomendadas para inoculação, tanto pelo sentido “forward” quanto pelo “reverse”, apresentaram correspondência com suas respectivas parentais na sequência de bases dessa região cromossômica conservada em relação à identidade de sequências. Entretanto, a Semia 6069 (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou homologia com sequências de *Rhizobium* sp.; a Semia 6161 (*Bradyrhizobium* sp.) e Semia 6162 (*Bradyrhizobium* sp.) apresentaram homologia com *Ensifer* sp.; a Semia 3012 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) e Semia 396 (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) apresentaram homologia com *Mesorhizobium* sp.; a Semia 6168 (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou homologia com *R. tropici* e a Semia 6153 (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou homologia com *Sinorhizobium xinjiangensis*. Em todos estes casos as homologias foram verificadas em ambos os sentidos das sequências obtidas.

Menna et al. (2006) estudaram 66 estirpes de rizóbios Semia pelo sequenciamento do gene *16S rRNA* e pela construção de árvores filogenéticas e detectaram que não há uma relação evidente entre a diversidade do gene *16S rRNA* dessas estirpes e a especificidade de suas plantas hospedeiras. Muitas delas, quando tiveram suas sequências comparadas no banco de dados Blastn, apresentaram classificação diversa à sugerida pela Mircen (Microbial Resources Centre Network). Os autores concluíram que o conhecimento genético sobre essas estirpes ainda é bastante deficiente. Vinte e duas das estirpes estudadas por Menna et al. (2006) são coincidentes com as do presente estudo.

As sequências das estirpes Semia 103, Semia 396, Semia 6157, Semia 6161 e Semia 6192, depositadas no banco de dados mundial (NCBI) por Menna e colaboradores, permaneceram entre as cinco com maior

identidade de sequências com aquelas do presente estudo quando analisadas no Blastn. Além destas, as estirpes Semia 135, Semia 587, Semia 656, Semia 695, Semia 816, Semia 2051, Semia 3007, Semia 5019, Semia 5080, Semia 6145, Semia 6156, Semia 6158, Semia 6168, Semia 6175 e Semia 6319 apresentaram identidade de sequências com as espécies das estirpes semelhantes, que foram sequenciadas por Menna. Atualmente, Semia 396, Semia 6161 e Semia 6168 têm como classificação, respectivamente, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos por Menna et al. (2006) e os do presente estudo, essas estirpes deveriam ser classificadas como *Rhizobium* sp., *Ensifer* sp. e *Mesorhizobium ciceri*, respectivamente. Também, as estirpes Semia 587, Semia 5019, Semia 6157, Semia 6158 e Semia 6175 ficaram agrupadas com *B. elkanii*, enquanto a estirpe Semia 5080 ficou agrupada com *B. japonicum* nas árvores construídas neste trabalho, o que corrobora os resultados de sequenciamento do gene *16S rRNA* obtidos por Menna et al. (2006). Observa-se que algumas dessas 22 estirpes coincidentes não apresentaram identidades de sequências. É o caso da estirpe Semia 384, cuja classificação atual é de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, que manteve esta classificação no presente trabalho, embora Menna et al. (2006) tenham sugerido classificá-la como *R. etli*, e o caso da estirpe Semia 6069 que apresentou identidade de sequência com *Rhizobium* sp. no presente estudo, cuja classificação atual é *Bradyrhizobium* sp., e proposta como *B. elkanii* por Menna et al. (2006).

As sequências “forward” e “reverse”, obtidas do Genbank (NCBI), produziram árvores idênticas, conforme o esperado, e dividiram as estirpes em alguns grupos (Figura 1). As estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* formaram um grupo monofilético. As estirpes *Mesorhizobium mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. huaii*, *M. plurifarium*, *M. loti* e *M. ciceri* formaram outro grupo monofilético. As estirpes de *Ensifer teranga*, *E. meliloti* e *E. fredii* formaram um grupo mais proximamente relacionado ao grupo monofilético das estirpes de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. mongolense*, *R. gallicum*, *R. yanglingense*, *R. galegae*, *R. huautlense*, *R. undicola* e *R. giardinii*). Na árvore filogenética construída pelo sentido “forward” com as estirpes estudadas, foi observada uma clara divisão de um

Tabela 1. Identificação de estirpes de rizóbios pela sequência parcial dos genes *16S rRNA* obtida nos sentidos “forward” e “reverse” com o Blastm⁽¹⁾.

Estirpe	Classificação atual	Verossimilhança ⁽²⁾ 16S “forward”	S ⁽³⁾ – Id ⁽⁴⁾ – Frag. ⁽⁵⁾	Genbank ⁽⁶⁾	Verossimilhança ⁽²⁾ 16S “reverse”	S ⁽³⁾ – Id ⁽⁴⁾ – Frag. ⁽⁵⁾	Genbank ⁽⁶⁾
Semia 103	<i>Ensifer meliloti</i>		1201 – 97% – 487pb	D14509	<i>Sinorhizobium</i> sp.	1296 – 95% – 559pb	L39882
Semia 135	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp.	1037 – 95% – 481pb	EF035061	<i>Rhizobium</i> sp.	1405 – 96% – 582pb	AF054930
Semia 344	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1166 – 96% – 463pb	U89824	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1328 – 94% – 520pb	RLU29386
Semia 384	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium mongolense</i>	1178 – 97% – 530pb	U89820	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1082 – 96% – 486pb	U89829
Semia 396	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	500 – (e-139) – 96% – 205pb	EF035058	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1417 – 98% – 595pb	AJ417082
Semia 587	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1063 – 98% – 477pb	AF208510	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1398 – 96% – 561pb	AF208510
Semia 656	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1021 – 97% – 434pb	AJ301630	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	807 – 91% – 279pb	AY904748
Semia 695	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	652 – 90% – 240pb	AB220167	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	874 – 95% – 255pb	AF208510
Semia 816	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1197 – 97% – 541pb	AY491075	<i>Mesorhizobium loti</i>	1088 – 97% – 453pb	Y14159
Semia 928	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1072 – 98% – 500pb	AF363148	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1219 – 95% – 505pb	AY491080
Semia 929	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	662 – 92% – 246%	Z94812	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1207 – 97% – 503%	AF236086
Semia 2002	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	890 – 94% – 278pb	U31074	<i>Rhizobium</i> sp.	1003 – 96% – 435pb	EF035072
Semia 2050	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	646 – 97% – 291pb	U31074	<i>Rhizobium</i> sp.	864 – 96% – 342pb	EF035072
Semia 2051	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	583 – (e-164) – 96% – 286pb	EF035071	<i>Rhizobium</i> sp.	1205 – 94% – 472pb	U29386
Semia 3007	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	684 – 93% – 277pb	AF506053	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1243 – 97% – 474pb	U31074
Semia 3012	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	844 – 98% – 312pb	EF035058	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1386 – 95% – 550pb	AJ417085
Semia 3025	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	1174 – 98% – 498pb	EF035071	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1291 – 94% – 544pb	U31074
Semia 4080	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	1116 – 99% – 526pb	EF035059	<i>Rhizobium</i> sp.	1394 – 95% – 574pb	Z94806
Semia 5019	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1193 – 98% – 526pb	AF208510	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1459 – 97% – 585pb	AF208510
Semia 5080	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	504 – (e-140) – 97% – 220pb	AF293381	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1201 – 94% – 445pb	AF208503
Semia 6069	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	1033 – 97% – 481pb	AY206687	<i>Rhizobium</i> sp.	1193 – 95% – 497pb	Z94806
Semia 6144	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	771 – 96% – 349pb	AF293381	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1094 – 94% – 427pb	AF208505
Semia 6145	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	934 – 95% – 375pb	AY904732	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1219 – 96% – 501pb	AF417550
Semia 6153	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	605 – (e-171) – 92% – 209pb	AF250377	<i>Sinorhizobium</i> sp.	1354 – 96% – 587pb	AF268072
Semia 6154	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1146 – 97% – 491pb	D86354	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1427 – 96% – 575pb	AF514704
Semia 6156	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	350 – 98% – 472pb	AJ301630	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1316 – 97% – 556pb	AF208510
Semia 6157	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1041 – 98% – 456pb	U35000	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1205 – 96% – 542pb	AF208511
Semia 6158	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	753 – 90% – 222pb	Z94821	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	997 – 93% – 393pb	Z94821
Semia 6161	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Sinorhizobium saheli</i>	684 – 90% – 191pb	X68390	<i>Sinorhizobium</i> sp.	1089 – 95% – 361pb	AF285964
Semia 6162	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Sinorhizobium</i> sp.	529 – (e-148) – 95% – 205pb	AF285963	<i>Sinorhizobium</i> sp.	1112 – 96% – 456pb	AF285963
Semia 6168	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>	842 – 94% – 257pb	AF260274	<i>Rhizobium tropici</i>	997 – 94% – 295pb	AF260274
Semia 6175	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	914 – 97% – 443pb	AF208510	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1181 – 96% – 459pb	AF208510
Semia 6192	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	791 – 91% – 268pb	AY039015	<i>Bradyrhizobium lupini</i>	831 – 94% – 256pb	U69637
Semia 6209	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	874 – 92% – 247pb	AF321212	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	890 – 95% – 291pb	AF321212
Semia 6319	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	757 – 93% – 285pb	AF363136	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1370 – 97% – 568pb	AF363136
LMG14107	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	803 – 97% – 380pb	D13431	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1255 – 96% – 566pb	Z94807
LMG14919	<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp.	692 – 96% – 336pb	AM284998	<i>Sinorhizobium arboris</i>	1181 – 96% – 442pb	AM181738
LMG17148	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	880 – 97% – 441pb	AJ417085	<i>Rhizobium mediterraneum</i>	1241 – 98% – 547pb	L38825
LMG18254	<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	1332 – 96% – 525pb	Y12352	<i>Rhizobium</i> sp.	1068 – 95% – 444pb	EF100525
LMG18864	<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp.	551 – (e-155) – 96% – 232pb	AM284998	<i>Sinorhizobium medicae</i>	957 – 93% – 346pb	CP000738
LMG19592	<i>Rhizobium yanglingense</i>	<i>Rhizobium gallicum</i>	765 – 97% – 319pb	U86343	<i>Rhizobium</i> sp.	1271 – 96% – 569pb	EF107504
LMGH152	<i>Rhizobium giardinii</i> bv. <i>giardinii</i>	<i>Rhizobium giardinii</i>	1067 – 97% – 499pb	U86344	<i>Rhizobium</i> sp.	1465 – 97% – 614pb	AF511492

⁽¹⁾Valores entre parênteses indicam a probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas sequências; nos demais casos a probabilidade foi nula. ⁽²⁾Verossimilhança, organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene *16S rRNA* da estirpe estudada apresentou maior homologia. ⁽³⁾S (Score), pontuação do alinhamento. ⁽⁴⁾Id (Identidade), percentagem de identidade entre a sequência das estirpes estudadas e o organismo relacionado. ⁽⁵⁾Frag. (Tamanho do fragmento), tamanho da sequência relacionado. ⁽⁶⁾GenBank, número de acesso da sequência do organismo relacionado.

grupo de *Bradyrhizobium* em dois subgrupos: um subgrupo composto por *Bradyrhizobium* sp. (estirpes Semia 587, Semia 6157, Semia 6175, Semia 656, Semia 6156, Semia 928, Semia 6154 e Semia 5019) agrupado com a espécie *B. elkanii*; e outro subgrupo que contém *Bradyrhizobium* sp. (estirpes Semia 929, Semia 6145, Semia 5080 e Semia 6144) agrupado com *B. japonicum* (Figura 2). Na árvore construída pelo sentido “reverse”, foi observado o mesmo tipo de agrupamento, porém o grupo monofilético das estirpes semelhantes a *B. elkanii* incluiu as mesmas da árvore “forward”, com exceção das Semia 928 e Semia 6154, que, nesta árvore, entraram no grupo de *B. japonicum*, e incluiu também as Semia 695 e Semia 6158, que na árvore “forward” formavam um grupo à parte (Figura 3). O grupo de estirpes semelhantes a *B. japonicum* da árvore obtida pela direção “reverse” compreendeu Semia 929, Semia 6145 e Semia 5080 (como na árvore “forward”), além das estirpes Semia 6319, Semia 6192 e Semia 6209 (que estavam em um grupo à parte na árvore “forward”) e Semia 928 e Semia 6154 (que estavam próximas a estirpes de *B. elkanii* na outra árvore). A dificuldade em separar espécies de *Bradyrhizobium* deve-se à baixa variabilidade genética entre elas, o que impossibilita, muitas vezes, a diferenciação entre *B. japonicum* e *B. elkanii* (Chueire et al., 2000).

Na árvore construída pelo sentido “forward”, as estirpes de *Rhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium* permaneceram intercaladas, formando grupos

polifiléticos, como ocorreu na árvore construída pelo sentido “reverse” do *16S rRNA*. A árvore obtida pelo sentido “reverse” formou um grupo composto pelas estirpes de *Mesorhizobium* LMG 17148, LMG 14107, Semia 3012, Semia 816 e Semia 396. Embora a estirpe Semia 396 seja classificada atualmente como *R. leguminosarum* bv. *viceae*, segundo este trabalho e o de Menna et al. (2006) essa estirpe corresponde a *Mesorhizobium* sp. As estirpes de *Ensifer* LMG 14919, LMG 18864, Semia 6153, Semia 103, Semia 135, Semia 6161 e Semia 6162 permaneceram próximas entre si e mais diretamente relacionadas ao conjunto de estirpes de *Rhizobium* sp., composto por H152, Semia 6168, Semia 2002, Semia 4080, Semia 6069, Semia 2051, Semia 344, Semia 3025, Semia 384, Semia 3007, Semia 2050 e LMG 19592. É importante observar que as estirpes Semia 6162 e Semia 6168, ambas classificadas atualmente como *Bradyrhizobium* sp., pelos resultados deste trabalho e os de Menna et al. (2006) deveriam ser reclassificadas como *Ensifer* sp. e *Rhizobium* sp., respectivamente. As estirpes Semia 384 e Semia 6069, classificadas como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *Bradyrhizobium* sp., respectivamente, de acordo com a árvore obtida pelo sentido “forward” e pelo sentido “reverse” permaneceram agrupadas com estirpes de *Rhizobium*, diferentemente do sugerido por Menna et al. (2006), o que confirmou os resultados da análise de similaridade (Blastn).

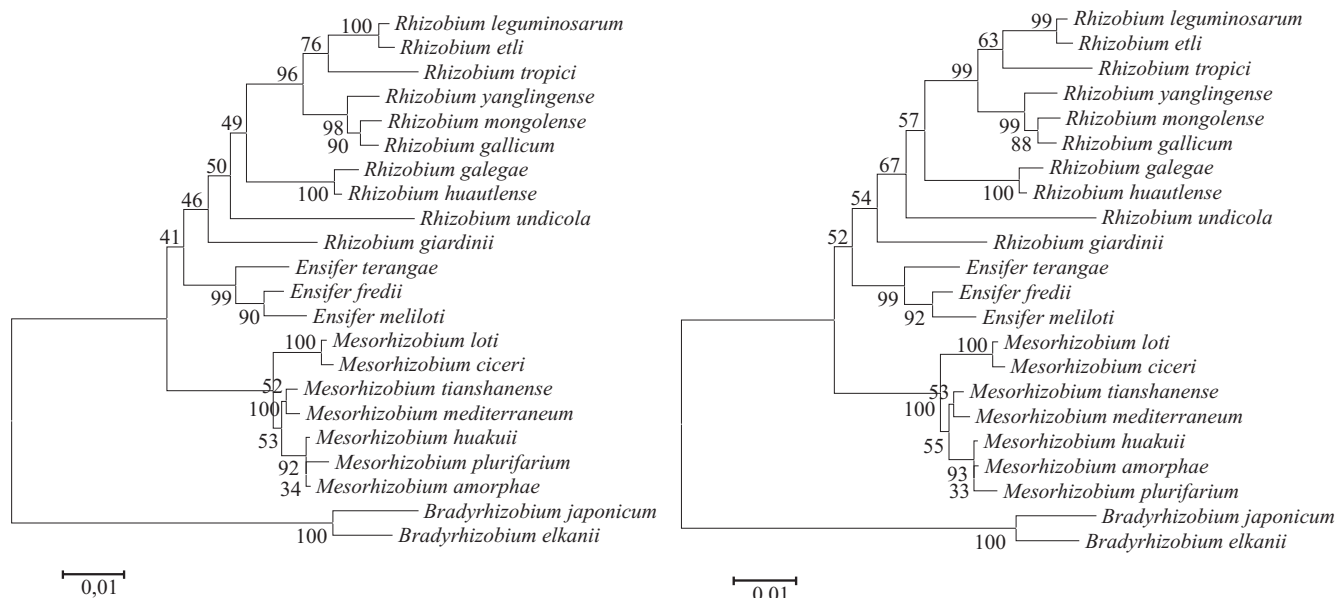


Figura 1. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências parciais do gene *16S rRNA* obtidas pelo sentido “forward” (à esquerda) e “reverse” (à direita), no Genbank. Valores de “bootstrap” estão indicados na árvore.

Informações sobre a estrutura das populações de rizóbios, bem como sobre a evolução dos microssimbiontes, são importantes, porque podem contribuir não só para delinear estratégias que visem maximizar o processo de fixação biológica do nitrogênio, como também para obter informações sobre a evolução da simbiose (Grange et al., 2007). A classificação taxonômica das estirpes *Semia* recomendadas para inoculação de leguminosas previamente disponíveis na Fepagro, elaborada com

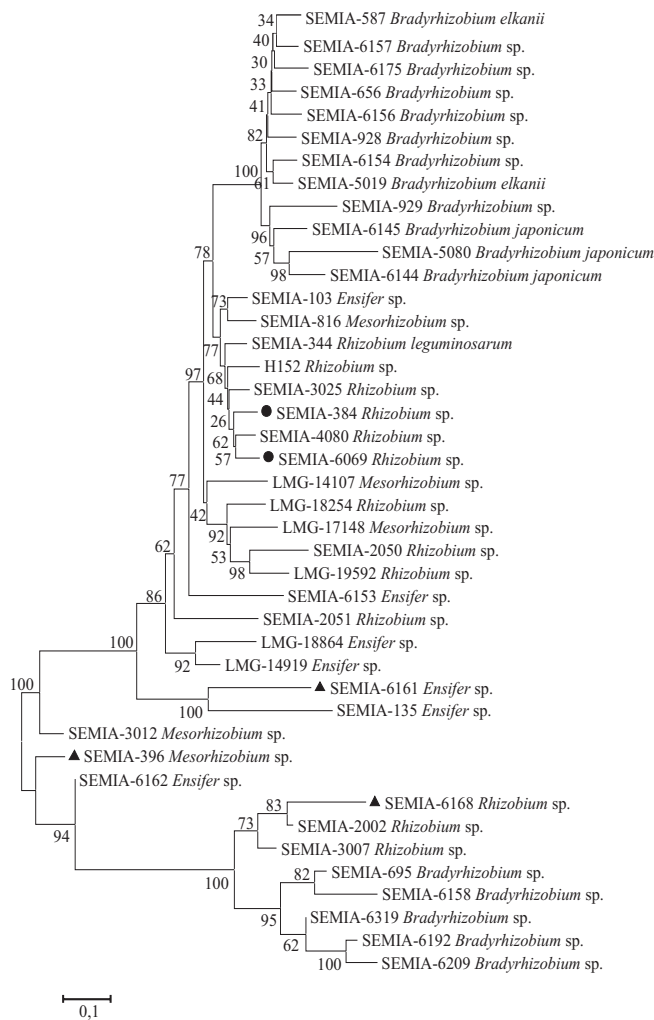


Figura 2. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene *16S rRNA* das estirpes estudadas, obtidas pelo sentido “forward”. ▲, estirpes que neste trabalho e no de Menna et al. (2006) obtiveram classificação diferente da atualmente conhecida; ●, estirpes que neste trabalho obtiveram classificação diferente da sugerida por Menna et al. (2006). Valores de “bootstrap” estão indicados na árvore.

base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira, foi confirmada para a maior parte das estirpes. Entretanto, algumas foram identificadas como pertencentes a outros gêneros. As estirpes *Semia* 6162, *Semia* 6161, *Semia* 6153 e *Semia* 6144, que são classificadas como *Bradyrhizobium* sp. neste trabalho, foram caracterizadas como estirpes do gênero *Ensifer*. As estirpes *Semia* 3012 e *Semia* 396, classificadas como

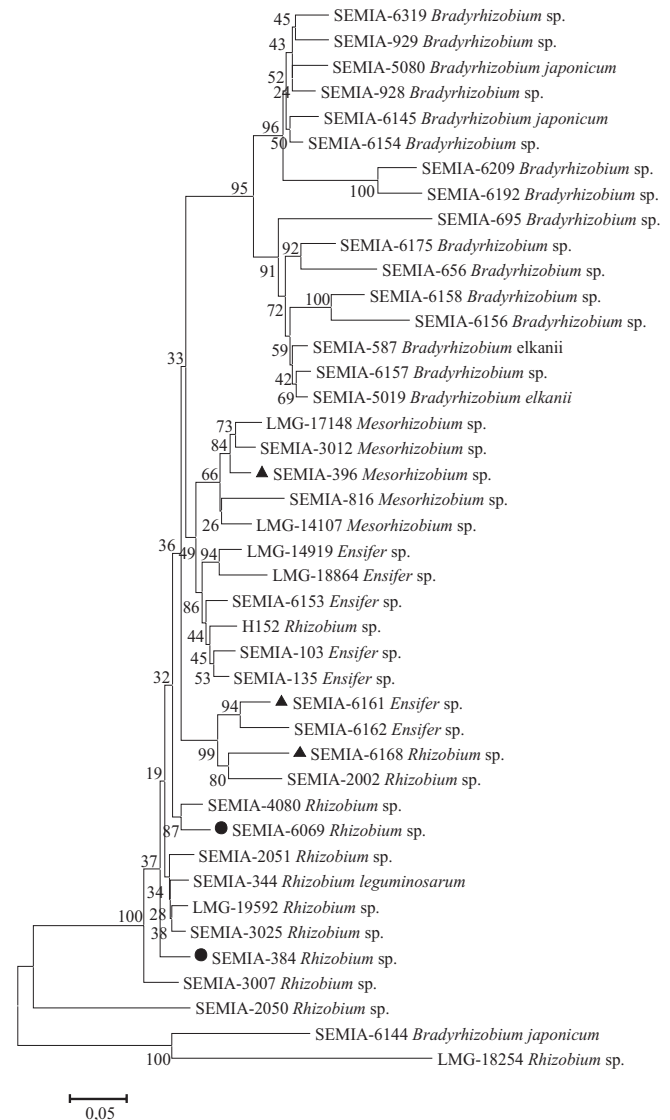


Figura 3. Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene *16S rRNA* das estirpes estudadas, obtidas pelo sentido “reverse”. ▲, estirpes que neste trabalho e no de Menna et al. (2006) obtiveram classificação diferente da atualmente conhecida; ●, estirpes que neste trabalho obtiveram classificação diferente da sugerida por Menna et al. (2006). Valores de “bootstrap” estão indicados na árvore.

R. leguminosarum bv. *viciae*, foram caracterizadas como *Mesorhizobium* sp. neste trabalho; as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Semia 6168 e Semia 6069 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Ao se considerarem as árvores filogenéticas, observa-se que a grande maioria dos grupos monofiléticos formados obedecem às classificações realizadas pela consulta ao Blastn.

Conclusão

O sequenciamento parcial da região do gene *16S rRNA* é suficiente para a identificação de estirpes de rizóbios com base na similaridade desse gene no Blastn.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BERINGER, J.E.R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.
- BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.75, p.4801-4805, 1978.
- CHUEIRE, L.M. de O.; NISHI, C.Y.M.; LOUREIRO, M. de F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v.4, p.80-95, 2000.
- EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-85, 1998.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Culture collection catalogue**. 8th ed. Porto Alegre: Fepagro, 1999.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CATENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1. p.119-166.
- GARRITY, G.M.; LILBURN, T.G.; COLE, J.R.; HARRISON, S.H.; ENZEBY, J.; TINDALL, B.J. **Taxonomic outline of bacteria and archaea**: TOBA release 7.7. Michigan: Michigan State University, 2007. Disponível em: <<http://www.taxonomicoutline.org>>. Acesso em: 1^o mar. 2008.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAN, P.H.; MARTINEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p.21-132.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Faseb Journal**, v.7, p.113-123, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.
- WILSON, K.H.; BLITCHINGTON, R.B.; GREENE, R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1942-1946, 1990.