

Diversidade de estirpes do gênero *Burkholderia* em solos do cerrado brasileiro baseado no sequenciamento do gene ribossomal 16S

SOUZA, R.C.^{1,2}; HUNGRIA, M.². ¹Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, ²Embrapa Soja, caixa postal, 231, 86001-970, Londrina, Paraná.
e-mail: renata@cnpso.embrapa.br.

Introdução

A região dos cerrados ocupa área contínua de 207 milhões de hectares, 20% do território nacional. Os solos do cerrado possuem características de alta acidez, alta saturação por alumínio e baixa concentração de nutrientes. (Adamoli *et al.*, 1986). O solo é considerado um dos mais diversos habitats da Terra, onde em apenas um grama de solo contém milhares de bactérias, porém somente de 1 a 10% são conhecidas. (Hawksworth, 1991). No solo, também estão presentes bactérias do gênero *Burkholderia* que fazem parte da classe beta-Proteobacteria (Menard *et al.*, 2007) e contém cerca de 30 espécies. Além do solo, algumas espécies são encontradas na água, incluindo água do mar, na rizosfera de plantas, em humanos, em várias espécies de animais e ambientes hospitalares (Coenye & Vandamme, 2003); além disso, podem ser de vida livre ou viver em simbiose ou em comensalismo com uma grande variedade de organismos (Payne *et al.*, 2005). Algumas espécies de *Burkholderia*, pertencentes ao chamado complexo cepacia, estão envolvidas em doenças e compreendem pelo menos nove espécies de bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, (Mahenthiralingam *et al.*, 2005). Por exemplo, burkholderias do complexo cepacia podem causar sérias infecções em pessoas com fibrose cística e outros indivíduos vulneráveis (Mahenthiralingam *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2007) além de doenças em animais e plantas (Payne *et al.*, 2005). Porém, outras espécies, estão sendo usadas para várias finalidades, incluindo controle biológico de patógenos de plantas, biorremediação de xenobióticos recalcitrantes (Coenye & Vandamme, 2003), promoção do crescimento em plantas (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001), e fixação biológica do nitrogênio (Menard, *et al.*, 2007). No entanto, o conhecimento da diversidade e distribuição de burkholderias simbiotes de leguminosas, bem como de sua ecologia, é ainda muito limitado e fragmentado (Garau *et al.*, 2008). Desse modo o objetivo desse trabalho foi determinar a diversidade de bactérias do gênero *Burkholderia* em solos do cerrado brasileiro através do sequenciamento do gene ribossomal 16S.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 17 estirpes provenientes de solos do Cerrado brasileiro isoladas do feijoeiro. As bactérias foram purificadas e, em seguida, repicadas em meio de cultura YM, a 28°C, confirmado quanto à pureza, pelo método do esgotamento (Vincent, 1970). O DNA das estirpes foi extraído, quantificado e amplificado pela técnica de PCR ("polymerase chain reaction") com os "primers" que flanqueiam o gene 16S rRNA. fD1 5'ccgaattcgtcgcacaacAGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' e rD1 5'cccgggatccaagcttAAG GAG GTG ATC CAG CC 3' (Weisburg *et al.*, 1991). Os produtos de amplificação por PCR foram purificados com o uso do kit Invitrogen *PureLink™ PCR purification* e depois submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação visual dos fragmentos.

Foi feita uma reação de PCR para sequenciamento utilizando DYE (*DYEnamic ETterminator reagent premix for the MegaBACE, Amershan Biosciences*) e as amostras submetidas a um aparelho sequenciador *MegaBACE 1000 DNA Analyses System (Amershan Biosciences)*. Em seguida foram analisadas com o auxílio dos programas "phred", "phrap" e "Consed", que para se obter uma alta qualidade destas seqüências, estas foram agrupadas em "contigs". As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências do banco de dados GenBank do NCBI baseando-se em similaridade de seqüências de nucleotídeo. Para as análises, as seqüências obtidas foram alinhadas com uso do programa ClustalX versão 1.83, e comparadas com as estirpes tipo "type strain". Para análises filogenéticas foram construídas árvores filogenéticas geradas com o uso do programa MEGA versão 4.0 (Kumar *et al.*, 2004) com análises de Neighbor Joining (NJ), e para dar um suporte estatístico para a árvore, esta foi avaliada com análise de *bootstrap* com 1000 repetições. Também foram realizadas análises de similaridade genética das seqüências do gene ribossomal 16S resultantes do sequenciamento das 17 estirpes de bactérias no programa Bionumerics, utilizando o algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*).

Resultados e Discussão

Na árvore filogenética do gene ribossomal 16S foram formados dois grupos, sendo que o grupo II foi subdividido em dois subgrupos. A estirpe *Caulobacter crescentus* CB15^T foi utilizada como "outgroup", isto é, referência como estirpe distante geneticamente das estirpes do estudo. Onze estirpes tipo do gênero *Burkholderia*: *B. unamae*, *B. nodosa*, *B. tropica*, *B. mimosarum*, *B. ferrariae*, *B. sacchari*, *B. kururiensis*, *B. caribensis*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* e *B. phenazinium* foram posicionadas no grupo I, junto com dez estirpes selecionadas do Cerrado, 1361, 1379, 1388, 1354, 1389, 1391, 1288, 1228, 1294 e 1213 (Fig.1). Com exceção da estirpe 1213 que apresentou 99% de similaridade com a estirpe *Burkholderia ferrariae*, todas apresentaram 100% de similaridade com *Burkholderia nodosa*.

No dendograma as estirpes pertencentes ao grupo I na árvore filogenética, foram agrupadas no grupo V com uma similaridade de 95,03% com *B. nodosa* (fig. 2). No grupo II da árvore filogenética, foram agrupadas as estirpes do gênero *Rhizobium*, e dois subgrupos foram observados. No subgrupo II.I, as estirpes 1207, 1312 e 1334 foram agrupadas com a estirpe tipo de *Rhizobium radiobacter*, com um *bootstrap* de 100%, mostrando ter maior semelhança genética com este (fig. 1). A partir da pesquisa no banco de dados NCBI, as estirpes 1312, 1334 e 1207, apresentaram 99% de similaridade com *Rhizobium radiobacter*. Esse agrupamento também foi confirmado usando o algoritmo UPGMA, e as estirpes do subgrupo II.I da árvore filogenética ficaram agrupados no grupo III do dendograma, apresentando 99,07% de similaridade com *R. radiobacter* (fig. 2). No subgrupo II.II da árvore com o método *Neighbour-Joining* as estirpes 142, 1315 e 1326 foram agrupadas com a estirpe tipo de *R. tropici* CIAT 899, e com *R. rhizogenes*, contudo, mostraram maior semelhança genética com a estirpe de *R. tropici*, com suporte de *bootstrap* de 86% (fig. 1). Em alinhamento no NCBI, essas estirpes apresentam 100% de similaridade com *R. tropici*. Na análise com algoritmo UPGMA essas estirpes ficaram agrupadas no grupo I do dendograma, com 99,2% de similaridade com *R. tropici*. A estirpe 1318 foi agrupada com *R. etli*, com um suporte de *bootstrap* de 97%, e 100% de similaridade utilizando a ferramenta BLASTN. No dendograma com o algoritmo UPGMA essa mesma estirpe (1318) apresentou 99,35% de similaridade com *R. etli* sendo agrupada no grupo II (fig. 2).

Diversas espécies de *Burkholderia* ocupam múltiplos nichos, podendo ser patógenos ou simbiontes de plantas e, também, patógenos oportunistas em humanos (Coenye & Vandamme, 2003). A maioria das espécies de *Burkholderia* deste trabalho, no entanto, são conhecidas como

bactérias do solo, no qual exibem diferentes tipos de interações não patogênicas com as plantas. A fixação biológica do nitrogênio com a formação de nódulos, foi descrita em algumas espécies como *B. vietnamensis* (Caballero-Mellado *et al.*, 2006), *B. kururiensis* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001) *B. tuberum*, *B. phymatum* (Vandamme *et al.*, 2002), *B. unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004), *B. tropica* (Reis *et al.*, 2004) e *B. xenovorans* (Goris *et al.*, 2004), e encontram-se agrupadas no grupo I da árvore filogenética (Fig. 1) e no grupo V do dendograma (Fig. 2), junto com as estirpes isoladas do solo do Cerrado, mostrando a evolução e a similaridade das estirpes isoladas com sua capacidade em formar nódulo e fixar nitrogênio, em comparação com as estirpes tipo. As estirpes *B. nodosa* e *B. mimosarum* são simbiontes efetivas do gênero *Mimosa* (Chen *et al.*, 2005).

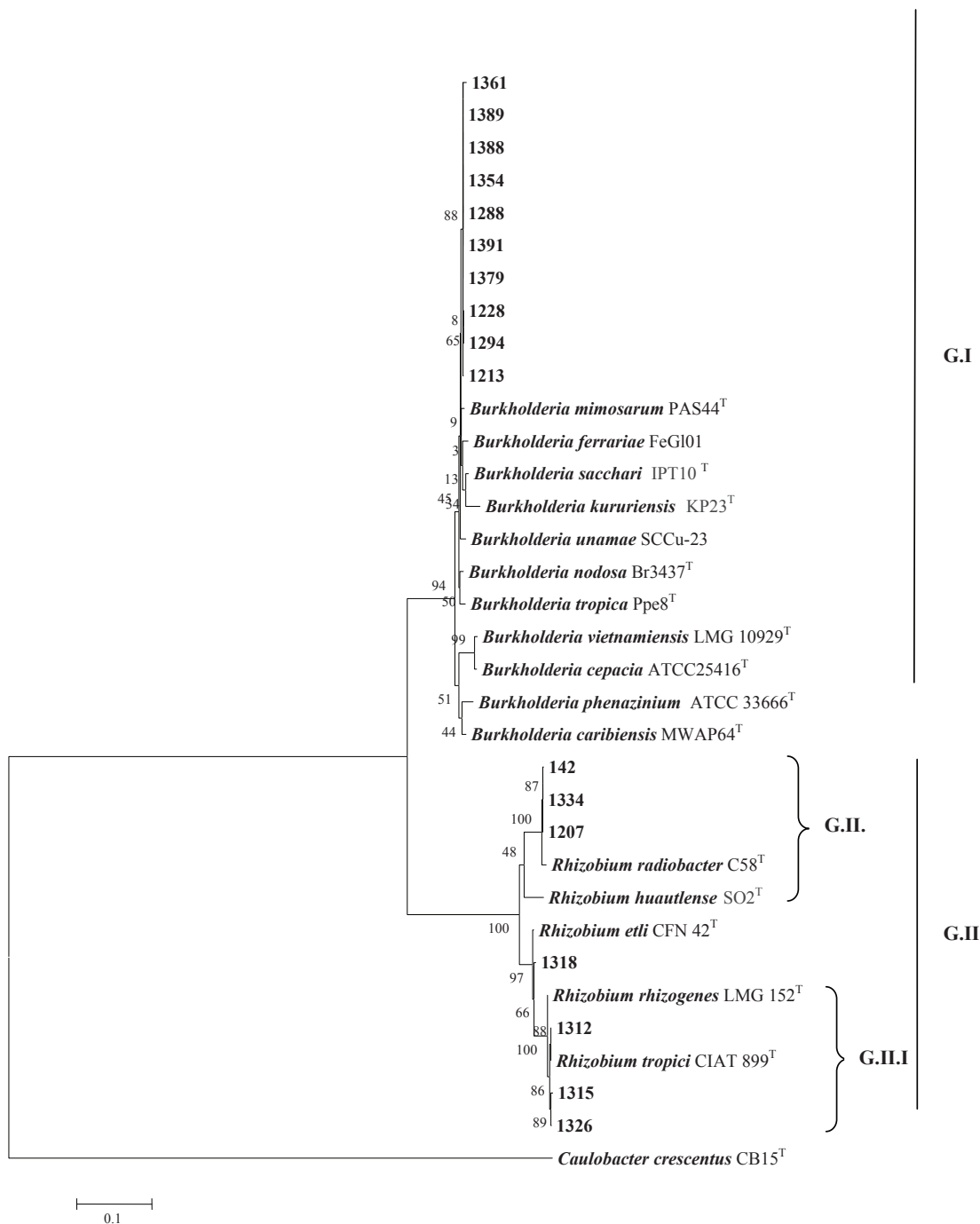


Figura 1 - Filogenia da árvore baseada no gene ribossomal 16S, com 17 estirpes provenientes dos solos do Cerrado brasileiro. Foram utilizadas em conjunto, na análise, estirpes representativas das espécies mais próximas (type strain; o número de acesso no GenBank consta do item de material e métodos). A árvore foi gerada usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método *Neighbour-Joining*.

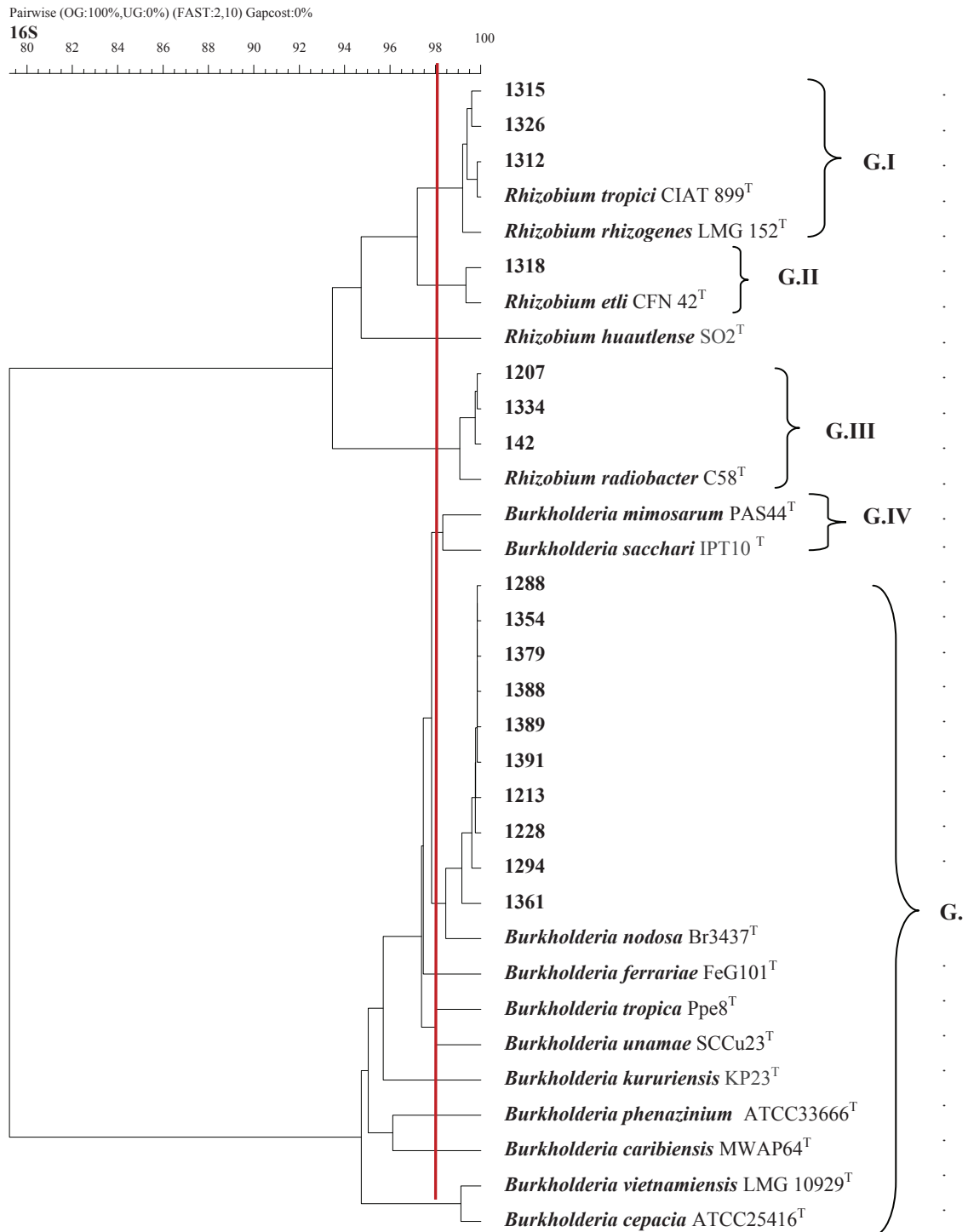


Figura 2 – Dendrograma obtido pela análise da sequência do gene 16S de 17 estirpes de bactérias, além de algumas estirpes tipo. Foi utilizado o algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*) no programa Bionumerics.

Conclusão

Foi observado a partir da análise do gene ribossomal 16S, que a diversidade inter-específica dentro do gênero *Burkholderia* foi baixa, visto que todas elas agruparam-se no mesmo grupo, tanto na árvore filogenética, quanto no dendrograma, resultado da alta similaridade entre elas. As outras estirpes isoladas apresentaram baixa similaridade com o grupo das burkholderias, se agrupando dentro do grupo do gênero *Rhizobium*.

Referências

- ADAMOLI, J.; MACÊDO, J.; AZEVEDO, L. G.; NETTO, J. M. Caracterização da região dos Cerrados. In: GOEDERT, W. J. **Solos dos Cerrados, tecnologias de manejo**. São Paulo: Editora Nobel, 1986. p.33-74.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., na N₂-fixing rhizospheric and endophytic espécies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1165-1172, 2004.
- CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 48, n. 2, p.154-161, 2006. Disponível em: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/microbiologiaagricola.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2010.
- CHEN, W.-M.; FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; CHOU, Y. J. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, p.7461-7471, 2005.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v.5, p.719-729, 2003.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2790-2798, 2001.
- GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**, p1-10, 2008.
- GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J. H.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J. M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1677-1681, 2004.
- HAWKSWORTH, D.L. The biodiversity of microorganisms and invertebrates. It's role in sustainable agriculture. In: HAWKSWORTH, D.L. (Ed.), **Importance of invertebrates and microorganisms as components of biodiversity**. Melksham: CAB International: Redwood Press, 1991, p. 302.
- 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.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature**, v.3, p.144-156, 2005.
- MENARD, A.; MONNEZ, C. ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; SEGONDS, C.; CABALLERO-MELLADO, J. LIPUMA, J. J.; CHABANON, G.; COURNOYER, B. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of nif gene deletions and auxotrophic mutations. **Environmental Microbiology**, v.9, n.5, p.1176-1185, 2007.
- PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN,

A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71,n.7, p.3917-3927, 2005.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155-2162, 2004.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, WM.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.507-512, 2002.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.