

## Emprego da metodologia de MLSA em avaliações de filogenia e taxonomia de rizóbios: estudo com *Rhizobium* spp. microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Ribeiro, R.A.<sup>1,2\*</sup>, Delamuta, J.R.M.<sup>1,2</sup>, Hungria, M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia do Solo; Embrapa Soja. <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Universidade Estadual de Londrina).

\* renan.ribeiro@embrapa.br

### RESUMO

Estudos taxonômicos desempenham um papel relevante na valoração da diversidade microbiana do solo. A metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) tem possibilitado incrementar o conhecimento da biodiversidade bacteriana do solo, bem como a descrição de novas espécies. Neste estudo, quatro genes *housekeeping* foram utilizados para estabelecer as relações filogenéticas entre 19 estirpes de *Rhizobium* spp. microssimbiontes do feijoeiro. Além de obter maior definição das relações filogenéticas, o MLSA indicou possíveis novas espécies de rizóbios ainda não descritas.

### INTRODUÇÃO

A diversidade procariótica presente no solo é elevada, particularmente nos trópicos, mas um grande desafio consiste em classificar os microrganismos, identificando o seu potencial biotecnológico em favor de maiores rendimentos das culturas e sustentabilidade ambiental. Nesse contexto, estudos taxonômicos são fundamentais e a metodologia de MLSA aponta como uma ferramenta de grande utilidade. O objetivo deste trabalho foi o de elucidar as relações filogenéticas e a taxonomia de *Rhizobium* spp. microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), através da análise do gene 16S rRNA e de quatro genes *housekeeping*.

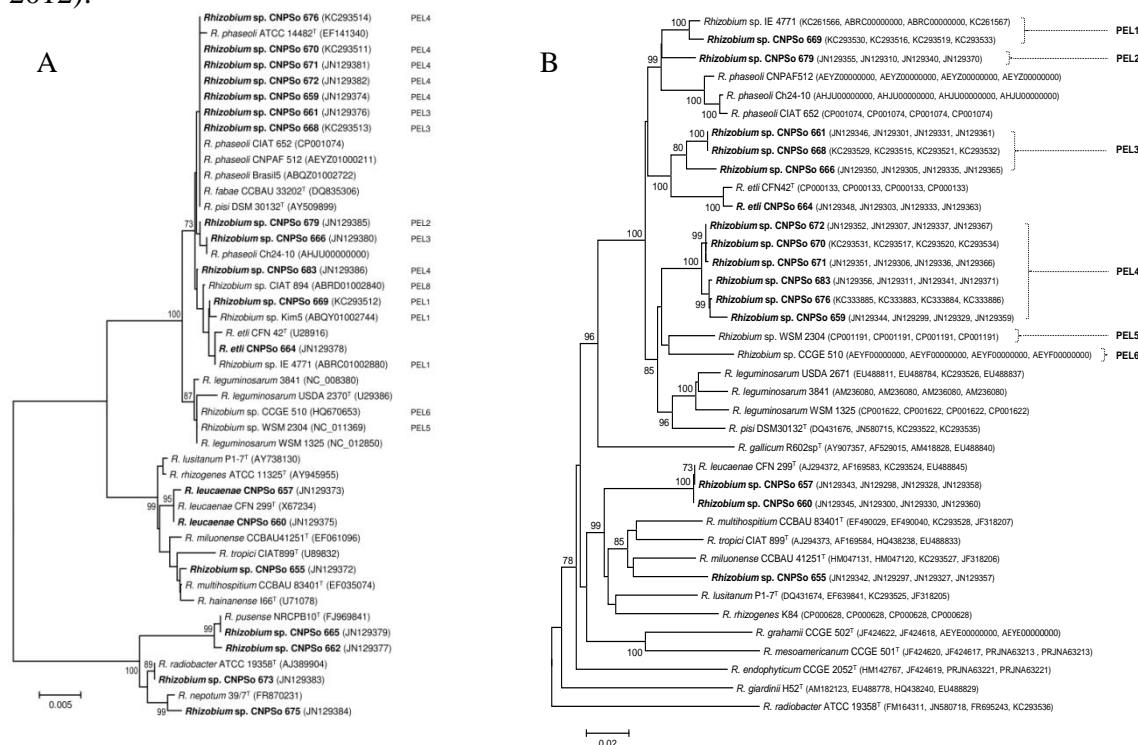
### MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 19 estirpes de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro, isoladas de regiões andinas, mesoamericanas e do Brasil. A extração do DNA, os *primers*, as condições de amplificação dos genes 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *gyrB* e *rpoA*, bem como a purificação dos produtos de PCR, o sequenciamento e a construção das árvores filogenéticas foram realizadas conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2009).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na árvore do 16S rRNA, das 19 estirpes analisadas, 12 foram posicionadas no grupo de *R. etli*, três se posicionaram no de *R. tropici* e as demais foram alocadas no grupo de *R. radiobacter*. O baixo poder de resolução do gene 16S rRNA não permitiu boa definição da posição taxonômica das estirpes deste estudo, principalmente daquelas do grupo *R. etli* (Figura 1A). As sequências concatenadas e alinhadas resultaram em um fragmento comum de 1.846 nucleotídeos e foram utilizadas para a construção da árvore filogenética. Através da combinação das informações filogenéticas dos quatro genes *housekeeping* concatenados, obteve-se uma melhor resolução na definição das espécies, em comparação com a análise baseada em um único gene (Figura 1B). Novas linhagens, representando possíveis espécies novas foram evidenciadas na análise de MLSA. A estirpe CNPSo 669, do México, foi agrupada com a estirpe IE4771, previamente designada como *R. etli*; contudo, houve indicação de representar uma espécie independente de *R. etli* e *R. phaseoli*, recebendo a denominação de PEL1. A estirpe equatoriana CNPSo 679 foi posicionada independentemente como nova linhagem e denominada PEL2, enquanto as estirpes CNPSo 661, 666 e 668 formaram o grupo PEL3. As estirpes CNPSo 676, 683, 670, 671 e 672 do Equador e 659 do México

agruparam com um *bootstrap* de 100% e formaram outra nova linhagem, PEL4. As estirpes WSM2304 e CCGE510, embora tenham sido identificadas como *R. leguminosarum* na análise do 16S rRNA, formaram dois grupos por MLSA, PEL 5 e PEL6, respectivamente (Figura 1B.). A posição taxonômica de outras estirpes foi melhor definida, por exemplo, as estirpes brasileiras CNPSo 657 e 660 agruparam estreitamente com *R. leucaenae* (CFN 299<sup>T</sup>) e apresentaram a inserção de 72 nucleotídeos no gene 16S rRNA, o qual é característico da espécie (Ribeiro *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Árvore filogenética entre as estirpes de *Rhizobium* spp. e estirpes tipo, com base no gene 16S rRNA (A) e nos genes *housekeeping* concatenados (*recA*, *glnII*, *gyrB* e *rpoA*) (B).

## CONCLUSÃO

Quando comparada com a análise do gene 16S rRNA, a metodologia de MLSA permitiu melhor definição taxonômica de estirpes de *Rhizobium* microssimbiontes de feijoeiro provenientes de regiões andinas, mesoamericanas e do Brasil. Houve indicação de novas espécies, mostrando o poder de resolução do MLSA e confirmando o potencial elevado dessa técnica para o conhecimento da biodiversidade e para a definição taxonômica de estirpes com potencial biotecnológico.

## AGRADECIMENTOS

Projeto CNPq-Repensa 562008/2010-1.

## REFERÊNCIAS

- Ribeiro, R.A., *et al.* (2009). Res. Microbiol. 160: 297-306.  
 Ribeiro, R.A., *et al.* (2012). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1179-1184.