



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE MICROSSIMBIONTES DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus Vulgaris* L.) COM O USO DA
METODOLOGIA DE MLSA (MULTILOCUS
SEQUENCE ANALYSIS)**

Londrina
2008

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE MICROSSIMBIONTES DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus Vulgaris* L.) COM O USO DA
METODOLOGIA DE MLSA (MULTILOCUS
SEQUENCE ANALYSIS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Dr. Fernando Gomes Barcellos

Londrina
2008

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE MICROSSIMBIONTES DE
FEIJOEIRO (*Phaseolus Vulgaris* L.) COM O USO DA
METODOLOGIA DE MLSA (MULTILOCUS
SEQUENCE ANALYSIS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Fernando Gomes Barcellos

Mariângela Hungria da Cunha

Luciana Grange

Londrina, 22 de fevereiro de 2008.

DEDICO

Aos meus queridos pais que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado até nos momentos mais difíceis, e que também me servem de exemplo para toda a minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Mariangela e Fernando, que não mediram esforços para que este trabalho se realizasse e que são exemplos a ser seguidos tanto como pessoa quanto profissionalmente. Obrigado pela oportunidade e pela amizade, de coração.

A todos da minha família (mãe, pai, Victor, Matheus, tios e tias, primos, primas) que acreditaram em mim, e até mesmo os que já não se encontram mais conosco, mas que com certeza estão olhando por mim onde quer que estejam.

Aos amigos de laboratório, Jesi, Pâmela, Lígia, Alan, Leandro (tiozão) Fabinho, Rose, Maria, Renan, Adalgisa, Susan, Eliane, Luciana, Ilmara, Simone, Daysi, André, Lucas, Fábio, Dr. Rubens, Renan, Nágila, Adrian, Eriana, Priscila, Rinaldo, Leni, Rute, Rosa e Fabiana que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta conquista, seja em momentos de discussões científicas, ou até mesmo em conversas nada científicas, brincadeiras, desabafos e por ai vai. Obrigado por tudo mesmo!!

Ao pessoal do mestrado, principalmente Naty, Carlão (suvela), Lê e Kaká que desde a graduação estiveram ao meu lado seja em momentos de muito estudo seja em momentos de descontração.

Aos colegas de república, Hugão, Alan, Gustavo (Guardinha), Juvenil, Guilherme e Biro-Biro, pelo convívio e pela amizade.

Aos amigos do CTG, peões e prendas, obrigado por me acolherem tão bem.

À Dra Luciana Grange, pela disponibilidade, e por suas contribuições que com certeza enriqueceram muito este trabalho.

À EMBRAPA soja pela estrutura que me foi concedida para a realização deste trabalho e aos funcionários que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelo conhecimento transmitido e o apoio concedido.

**"Levo a vida devagar, pra não faltar amor...
Faço o melhor que sou capaz, só pra viver em paz!!"**

Marcelo Camelo (Los Hermanos)

RIBEIRO, Renan Augusto. **Taxonomia e filogenia de microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris* L.) com o uso da metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis)**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Os rizóbios são bactérias que vivem em simbiose com algumas leguminosas. Atualmente, a filogenia dos rizóbios, assim como de outros procariotos é baseada, principalmente, no gene ribossomal 16S, embora alguns estudos tenham demonstrado que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrer transferência lateral e recombinação genética, fazendo com que os resultados nem sempre possam refletir a verdadeira filogenia procariótica. Com o objetivo de minimizar esses efeitos foi proposta a técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), que utiliza mais que um *locus* gênico, resultando em uma análise mais precisa. Neste estudo, foram utilizadas 18 estirpes de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro, com o objetivo de correlacioná-las taxonomicamente e filogeneticamente, através da técnica de MLSA, utilizando cinco genes conservados e essenciais ao metabolismo microbiano (genes *housekeeping*) além do gene ribossomal 16S. As espécies de rizóbios descritas como simbiontes de feijão formaram grupos separados, tanto nas análises dos genes separadamente como na análise dos genes concatenados. As similaridades das sequências dos genes entre as cinco espécies tipo variaram de 95 a 100% para o gene ribossomal 16S e de 83 a 99% para os outros 5 genes. Os cinco genes podem assim ser utilizados como marcadores para o gênero *Rhizobium*, e com isso auxiliarão na identificação de rizóbios que venham a ser isolados. O MLSA também revelou uma grande diversidade genética entre as estirpes classificadas como *R. tropici*, demonstrando a evidência de novas espécies.

Palavras-chave: Rizóbio. Plantas - filogenia. Taxonomia vegetal. Microbiologia molecular.

RIBEIRO, Renan Augusto. **Taxonomia e filogenia de microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris* L.) com o uso da metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis)**. 2008. 58f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The diazotrophic bacteria that are collectively known as “rhizobia” are important for establishing symbiotic N₂-fixing associations with many legumes. These microbes have been used for over a century as an environmentally beneficial and cost-effective means of ensuring acceptable yields of agricultural legumes. The most widely used phylogenetic marker for identification and classification of rhizobia has been the 16S rRNA gene; however, this marker fails to discriminate some closely related species. In this study we have established the first multilocus sequence analysis (MLSA) scheme for the identification and classification of rhizobial microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). We have analyzed eighteen strains, including type strains and representatives of the biodiversity present in Brazilian soils, by means of sequencing *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII* and *rpoA* genes. Gene sequence similarities among the five type strains ranged from 95 to 100% for the 16S rRNA, and from 83 to 99% for the other five genes. Rhizobial species described as symbionts of common bean have also formed separated groups on the analysis of single and concatenated gene sequences, and clusters formed in each tree were 39 in good mutual agreement. The five additional loci may thus be considered as useful markers for the genus *Rhizobium*, and will allow underpinning the online identification of rhizobial isolates. The MLSA also revealed broad genetic diversity among strains classified as *R. tropici*, providing evidence of new species.

Keywords: *Rhizobium*. Plant taxonomists. Plants - phylogeny. Molecular microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 O FEIJOEIRO	14
3.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	15
3.3 Os RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO	16
3.4 TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA	17
3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS	22
3.6 TAXONOMIA E FILOGENIA NO GÊNERO <i>RHIZOBIUM</i>	25
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO	37
ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIAL AND METHODS	40
RESULTS AND DISCUSSION	43
REFERENCES	45

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma importante fonte de proteína, principalmente da população mais carente na América Latina e no Sul e Oeste da África (VELAZQUEZ et al., 1988; EMBRAPA, 2006). O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, mas em geral essa produção não é capaz de suprir a demanda interna; além disso, a produtividade média nacional é uma das mais baixas do mundo (CONAB, 2008; EMBRAPA, 2006). Uma das maneiras de aumentar a produtividade da cultura, no Brasil, com um baixo custo para o agricultor, é pela maximização do processo de fixação biológica de nitrogênio.

As bactérias chamadas coletivamente de "rizóbios" são capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio atmosférico (N₂) com algumas espécies da família Leguminosae (MENNA et al., 2006). Essas bactérias são, atualmente, classificadas em sete gêneros, com base na análise polifásica, incluindo características fenotípicas e genéticas, bem como dados de filogenia: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* (JORDAN, 1982; FRANK, 1889; CONN, 1942; DREYFUS et al., 1988; JARVIS et al., 1997; CHEN et al., 1988; de LAJUDIE et al., 1998), embora, a filogenia baseada no seqüenciamento do gene 16S RNAr, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Allorhizobium* sejam muito relacionados (WILLENS, 2006; TEREFWORK et al., 1998; de LAJUDIE et al., 1998). A partir dessas observações, Young et al. (2001), propuseram a união destes três gêneros para apenas um, *Rhizobium*, mas essa sugestão ainda não é totalmente aceita (FARRAND et al., 2003). Além disso, outras bactérias têm sido descritas como capazes de realizar a fixação de nitrogênio, dentre elas estão: *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium* dentro da classe *Alfaproteobacteria* e *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Cupriavidus* dentro das *Betaproteobacteria*.

Inicialmente, dentro do gênero *Rhizobium*, três espécies foram descritas: *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*, o qual mais tarde foi subdividido em três biovars, *R. leguminosarum* bv.viciae que nodula ervilha (*Pisum sativum*), *R. leguminosarum* bv trifolii, que nodula trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv phaseoli, que nodula o feijoeiro (JORDAN, 1984). Com os avanços das técnicas de biologia molecular e a identificação de novos isolados de várias regiões do mundo,

os rizóbios que nodulam o feijoeiro foram divididos em dois grupos, denominados tipo I e tipo II, devido à observação de características genéticas e fisiológicas distintas (MARTINEZ et al., 1985; QUINTO et al., 1985; BROM et al., 1988). Finalmente, em 1991, Martinez-Romero e colaboradores definiram que as estirpes do grupo II pertenceriam a uma nova espécie, denominada *R. tropici*, que ainda poderia ser subdividida em tipos IIA e IIB (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991). Dois anos depois, Segovia et al. (1993), através da análise da seqüência nucleotídica do gene ribossomal 16S, sugeriram que os rizóbios isolados de solos americanos e que haviam sido inicialmente classificados como pertencentes ao tipo I, fossem reclassificados em uma nova espécie, *Rhizobium etli*, cujo representante seria a estirpe-tipo CFN 42. *R. etli* e *R. leguminosarum* apresentam uma alta correlação, tanto para alguns genes simbióticos localizados em plasmídeos, como para algumas regiões cromossômicas, indicando a possibilidade de ter ocorrido transferência do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum*, bem como transferência gênica e recombinação entre estas duas espécies (AMARGER et al., 1997; SEGOVIA et al., 1993). Mais tarde, o mesmo processo pode ter ocorrido de *R. leguminosarum* bv. phaseoli para *R. gallicum* bv. phaseoli e *R. giardinii* bv. phaseoli (AMARGER et al., 1997).

No Brasil, o feijoeiro é nodulado por uma variedade de rizóbios: *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. giardinii*; além disso, também há relatos de nodulação por bactérias pertencentes a outros gêneros, como *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, bem como por bactérias que podem representar novas espécies (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004).

A atual classificação dos rizóbios, bem como para todos os procariotos, é baseada, principalmente, no gene ribossomal 16S (GARRITY; HOLL, 2001), com base nos estudos desenvolvidos inicialmente por Woese et al. (1977), que demonstraram a utilização desta molécula como um marcador filogenético universal. As principais razões para a escolha do gene 16S rRNA residem na sua baixa taxa de evolução, o que permite reter informações filogenéticas, na sua universalidade (está presente em todos organismos) e na baixa ocorrência de transferência horizontal (HARRIS et al. 2003). Contudo, embora a filogenia bacteriana seja baseada no gene ribossomal 16S, existem algumas desvantagens para o uso exclusivo deste gene: possíveis recombinações genéticas e transferência horizontal de genes, resultando em seqüências mosaicas e um alto nível de

conservação, fazendo com que espécies muito relacionadas nem sempre possam ser distinguidas (MARTENS et al., 2007; VINUESA et al., 2005; VAN BERKUM et al., 2003; SULLIVAN et al., 1996; GEVERS et al., 2005). Com isso, a filogenia baseada em apenas um único gene pode não refletir a correta evolução de um genoma como um todo (GAUNT et al., 2001). Com base nestas observações e a fim de minimizar esses efeitos, outros genes, com uma taxa de evolução mais rápida em relação ao gene ribossomal 16S, mas conservados suficientemente para reter informações filogenéticas, têm sido usados como marcadores filogenéticos alternativos (STACKEBRANDT et al., 2002; STEPKOWSKI et al., 2003; MARTENS et al., 2007). Como premissa para a sua utilização, esses genes devem estar presentes, em uma cópia simples, no genoma de todos os organismos estudados. O consenso atual é de que pelo menos cinco genes sejam necessários para uma classificação taxonômica confiável (GEVERS et al., 2005; STACKEBRANDT et al., 2002; ZEIGLER, 2003; THOMPSON et al., 2005).

A fim de ser aplicado na taxonomia bacteriana para definição de espécies e elucidação das relações taxonômicas entre espécies foi proposta a metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis), usando as seqüências de múltiplos genes, para a caracterização de um grupo diverso de procariotos como, por exemplo, um gênero inteiro (Gevers et al., 2005). Recentemente, o MLSA foi utilizado em diversos estudos taxonômicos em grupos de procariotos, como *Bulkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* e *Ensifer* (GEVERS et al., 2005; THOMPSON et al., 2005; MARTENS et al., 2007).

Devido ao grande número de microrganismos que ainda precisam ser identificados e classificados, e ao notável progresso nas técnicas de biologia molecular, a moderna biosistemática tem adquirido cada vez mais importância dentro da microbiologia, sendo de grande interesse a sua aplicação em estudos com rizóbios microssimbiontes de leguminosas.

2 OBJETIVO

Utilizar a metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) para definir as relações taxonômicas e filogenéticas entre 18 estirpes de *Rhizobium* microssimbiontes de feijoeiro, incluindo estirpes-tipo e estirpes isoladas de solos brasileiros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O FEIJOEIRO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante fonte de proteína vegetal e, também, de aminoácidos essenciais para a nutrição humana, representando a principal fonte de proteína para a população mais pobre na América latina (VELAZQUEZ et al.,1988). Considerando todos os gêneros e espécies de feijoeiro (feijoeiro é a planta e feijão o grão), a produção mundial, segundo a CONAB (2008), gira em torno de 19 milhões de toneladas, em um total de 107 países que o produzem. O Brasil se destaca como sendo o maior produtor dessa leguminosa em todo mundo, mas mesmo assim, essa produção não é suficiente para atender todo o mercado interno e isso devido, principalmente, a uma redução da área cultivada, que historicamente atingiu índices em torno de 6000 ha na década de 80, e que do ano de 2000 até os dias atuais dificilmente tem ultrapassado 4000 ha (CONAB 2008). Outro fator que contribui para essa defasagem é o baixo nível de produtividade, que, de acordo com a CONAB (2008) em 2006 foi de apenas 817 kg/ha, geralmente produzidos em pequenas e médias propriedades e utilizando sistemas com tecnologia deficitária. Em uma situação um pouco mais favorável, encontram-se algumas propriedades mais extensas, que por utilizarem sistemas de irrigação e altas doses de insumos, conseguem chegar a produtividades mais elevadas, como na Região Centro-Oeste, em que a produtividade média, em 2006, foi de 2083 kg/ha.

O consumo per capita do feijão no Brasil, atualmente, é de 12,7 kg/hab/ano, embora tenha atingido índices de 24 kg/hab/ano em meados da década de 1970 (EMBRAPA, 2008). O feijoeiro é originário das Américas, com centros de origem e domesticação na Mesoamérica (México e Guatemala), na zona leste dos Andes (KAPLAN, 1965, 1980; KAPLAN et al., 1973), um importante centro de domesticação do sul do Peru ao norte da Argentina e um possível terceiro centro na Colômbia (GEPTS, 1990; KAMI et al., 1995). De acordo com achados arqueológicos, seu cultivo foi traçado há mais de 6000 mil anos entre os nativos do Peru (KAPLAN et al., 1973; HUNGRIA et al., 1997).

No Brasil, o feijoeiro é cultivado sob uma tecnologia deficitária e em solos marginais, contendo baixos teores de matéria orgânica e pouca fertilidade, devido ao baixo retorno econômico da cultura e, juntos, esses fatores contribuem para uma baixa produtividade (ARAÚJO, 1994). Nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), é um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos (HUNGRIA et al., 1997).

3.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O N, após o carbono (C), o oxigênio (O) e o hidrogênio (H) é o elemento mais importante na constituição da matéria orgânica, sendo o quarto elemento mais abundante nas plantas e representando cerca de 8% a 16% de sua composição. O N é constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila, entre outros (Morgante, 2003). O nitrogênio (N) existe na natureza como nitrogênio molecular (N_2), íons de nitrato (NO_3), amônia (NH_3) ou incorporado em compostos orgânicos nitrogenados. Esse elemento participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como, produção de ácidos nucleicos e proteínas. Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de N_2 (79%), o N constitui um dos principais fatores limitantes à produção agrícola mundial, pois nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, devido à forte tripla ligação existente entre os dois átomos do N_2 (HUNGRIA et al., 1994). O N necessário para a cultura pode ser obtido, principalmente, de três formas: diretamente do solo, através do uso de fertilizantes nitrogenados e pela fixação biológica de N_2 (FBN), com o uso de inoculantes contendo bactérias (rizóbios) capazes de realizar a FBN.

O solo é uma fonte limitada desse nutriente, o qual se esgota após algumas culturas. Os fertilizantes, além de apresentarem um alto custo, contribuem para a contaminação do meio ambiente, além de utilizar petróleo como matéria-prima, ou seja, uma fonte de energia não renovável. A FBN é um processo realizado por determinados procariontes, denominados organismos fixadores de N_2 . As bactérias capazes de fixar biologicamente o N_2 , possuem uma enzima chamada dinitrogenase, que é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-

proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2 , a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina, a qual, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína que, então, reduzida, doa o elétron recebido para a Mo-Fe-proteína, a qual acumula os elétrons até que ocorram oito transferências concentrando oito elétrons, os quais são necessários para que a redução do N_2 à NH_3 ocorra (MORGANTE, 2003).

Estima-se que a fixação biológica do N_2 contribua com 65% da entrada anual de N na Terra, enquanto que a produção industrial de fertilizantes contribui com 24% e a fixação não-biológica com cerca de 10% (HUNGRIA et al., 2001).

3.3 Os RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO

Bactérias da ordem *Rhizobiales* formam estruturas altamente específicas, os nódulos, nas raízes de diversas espécies de plantas da família *Leguminosae*, onde ocorre a conversão do N atmosférico (N_2) a amônia, que é, então, incorporada em diversas formas de N orgânico (HUNGRIA et al., 1997).

A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor necessários para o processo de fixação biológica. As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1994).

Para que ocorra a formação dos nódulos, ambos, bactéria simbiótica e planta hospedeira, desenvolveram um complexo sistema de interação, mantendo uma constante comunicação molecular. Essa associação, denominada simbiose, faz com que bactérias simbióticas vivendo saprofiticamente no solo percebam sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira, geralmente flavonóides, os quais fazem com que as bactérias sejam atraídas em direção às raízes da planta, por quimiotactismo positivo (DROZDOWICZ, 1997).

Os flavonóides induzem a transcrição de genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias, conduzindo à síntese e secreção dos fatores Nod. Os fatores Nod são lipo-quitoligossacarídeos responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. As bactérias, então, são atraídas para a rizosfera, onde vão se multiplicar, colonizando os tricomas (pêlos) radiculares. Os tricomas enrolam-se, envolvendo grupos de bactérias que, em seguida, degradam uma porção da parede celular do tricoma, levando à invaginação do plasmalema. As bactérias, então, invadem o tricoma, utilizando o canal formado pela invaginação do plasmalema, originando o cordão de infecção (HUNGRIA et al., 1994; MORGANTE, 2003). A seguir, o cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando. A região do córtex da raiz, com intensa divisão celular, recebe o nome de nódulo primário. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção se ramifica para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias, contidas no interior de vesículas membranosas, são liberados dentro do citoplasma das células vegetais do nódulo primário. A partir desse estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias, que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras, param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bactérias especializadas na fixação de N₂, os bacteróides (MORGANTE, 2003).

3.4 TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA

De acordo com Vandamme e colaboradores (1996), a "Taxonomia" pode ser usada como sinônimo de "Biosistemática" ou somente "Sistemática" e é dividida em: classificação (ordenar os organismos em seus respectivos grupos taxonômicos baseando-se na similaridade entre eles), identificação (posicionar os organismos desconhecidos em seus devidos grupos taxonômicos) e nomenclatura (nomear os grupos taxonômicos), além de informações filogenéticas e de genética populacional, que contribuem para uma completa definição da biosistemática moderna.

Atualmente a taxonomia microbiana integra diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) para obter um consenso taxonômico, sendo denominada de taxonomia polifásica. Para estudos genotípicos, as informações são obtidas dos ácidos nucléicos, tanto do DNA como do RNA, e como exemplo podemos citar várias técnicas utilizadas para este fim, como por exemplo: porcentagem de G+C, hibridização DNA-DNA, padrões de restrição (RFLP, PFGE), seqüenciamento de genes e PCR-"fingerprinting" (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT, 2002). Por outro lado, as informações fenotípicas são extraídas das proteínas e suas funções, de marcadores quimiotaxonômicos e de outras características expressas. Os estudos fenotípicos incluem análises de morfologia, fisiologia, sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolissacarídeos, padrões enzimáticos (Multilocus Enzyme Electrophoresis), entre outros (VANDAMME et al., 1996; GILLIS, et al., 2001).

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana e desde a década de 1970 ela é definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe padrão, que apresentam 70% ou mais de similaridade por hibridização DNA-DNA (HDD) e 5°C, ou menos, nos valores de ΔT_m (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005). O símbolo T_m indica a temperatura média de desnaturação de uma fita dupla de DNA. Os dados de hibridização DNA-DNA e a ΔT_m obtidos ao longo do tempo, nas análises taxonômicas, são consistentes com os resultados obtidos mais recentemente, de seqüenciamentos completos de genomas e de dados de filogenia molecular com base no gene ribossomal 16S e de outros genes conservados (GEVERS, 2005). Embora a hibridização DNA-DNA seja amplamente utilizada para determinação de espécies na taxonomia bacteriana, as metodologias utilizadas em diferentes laboratórios apresentam variações na determinação dos valores de hibridização, fazendo com que os resultados não sejam reproduzíveis de um laboratório para outro (GEVERS et al., 2005; VANDAMME et al., 1996).

Zuckerkindl e Pauling (1965) propuseram a utilização de moléculas biológicas como documentos históricos evolutivos, podendo ser utilizadas para relacionar os organismos evolutivamente. Com o desenvolvimento das metodologias de seqüenciamento molecular, as idéias iniciais de Zuckerkindl e Pauling de deduzir a história filogenética dos organismos pela comparação das estruturas primárias das macromoléculas se tornaram aplicáveis.

Carl Woese e colaboradores (1977) demonstraram a utilidade do RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo (16S e 18S) como marcadores filogenéticos moleculares universais e, dentre os principais motivos dessa escolha, estão: *i)* a universalidade destes genes, devido ao seu envolvimento na síntese protéica; *ii)* a taxa de evolução baixa, que permite reter informações filogenéticas; *iii)* uma ocorrência relativamente baixa do evento de transferência horizontal (HARRIS et. al. 2003).

Assim, os estudos de Carl Woese sugeriram que a filogenia com base nos genes ribossomais 16S e 18S poderiam inferir uma relação natural entre os microrganismos, a qual refletisse a história evolutiva e na qual uma nova sistemática poderia estar baseada. Esses autores propuseram uma árvore filogenética universal com base nos genes ribossomais 16S e 18S onde os organismos foram agrupados nos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo as bactérias subdivididas nos domínios *Bacteria* e *Archaea* e os organismos eucariontes agrupados no domínio *Eucarya* (WOESE et. al., 1990).

A partir dos estudos de Carl Woese, o gene ribossomal 16S, assim como outros genes conservados evolutivamente, começaram a ser utilizados como "relógios moleculares", onde as substituições nucleotídicas nas seqüências de DNA são consideradas como diretamente proporcionais ao tempo evolutivo transcorrido na diferenciação das espécies e, através disso, foram feitas estimativas de tempo e de divergência entre os organismos (LLORET; ESPERANÇA, 2005)

Com relação ao gene ribossomal 16S, o consenso atual é de que bactérias apresentando seqüências com similaridades inferiores a 97% em relação à estirpe tipo da espécie podem indicar uma nova espécie e, a partir disso, microbiologistas podem identificar rapidamente isolados procarióticos através da comparação de suas seqüências do gene ribossomal 16S com as seqüências que já se encontram disponíveis nos bancos de dados (GEVERS et. al., 2005). Embora a filogenia bacteriana esteja baseada na análise do gene ribossomal 16S, atualmente vários estudos têm demonstrado que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrer transferência lateral e recombinação genética resultando em seqüências mosaicas (MARTENS et al., 2007; VINUESA et al., 2005; VAN BERKUM et al., 2003; SULLIVAN et al., 1996; GEVERS et al., 2005). Uma evidência disso está no trabalho de Martens et al. (2007), onde foram encontradas algumas incongruências nas árvores construídas para alguns genes, quando comparadas com a árvore

obtida com o gene ribossomal 16S, e isso pode indicar um evento de recombinação. Estas observações implicam que a análise filogenética bacteriana com base exclusivamente no gene ribossomal 16S pode nem sempre refletir exatamente a filogenia dos procariotos. Outra desvantagem do uso exclusivo desse gene nos estudos de taxonomia, filogenia e evolução é que espécies muito relacionadas nem sempre podem ser distinguidas, pelo fato destas apresentarem um alto nível de conservação nas seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S e, assim, as divergências evolutivas ocorridas podem não ser identificadas (STACKEBRANDT et al., 2002). Sendo assim, enquanto isolados pertencentes a espécies distintas apresentam menos que 97% de similaridade na seqüência do gene ribossomal 16S e, normalmente, valores de HDD inferiores a 70%, alguns isolados que possuem similaridade $\geq 97\%$ com base no gene ribossomal 16S, podem também apresentar valores de HDD inferiores a 70% e, portanto, não pertencem à mesma espécie, como observado em alguns estudos com bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* (JASPERS; OVERMANN, 2004; GEVERS et al., 2005). A partir dessas observações, foi proposto o termo microdiversidade, para descrever o fenômeno em que bactérias de diferentes populações, mas com o gene ribossomal 16S idêntico, possuem propriedades ecofisiológicas diferentes (GEVERS et al., 2005).

Atualmente, tem sido proposta uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana, a qual consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci), os quais apresentem uma taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais, mas com um nível de conservação suficiente para conter informações evolutivas (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; STACKEBRANDT et al., 2002). Desta forma, a análise conjunta de múltiplos genes poderia funcionar como um "tampão" contra efeitos de recombinação ou transferência lateral ocorridos em um único gene específico.

Assim, com base nesta estratégia foi desenvolvida e implementada, para muitos grupos bacterianos, principalmente em bactérias de interesse epidemiológico, a metodologia de "Multilocus Sequence Typing" (MLST). O MLST consiste no seqüenciamento e análise conjunta (como uma única seqüência concatenada) de no mínimo cinco genes "housekeeping" (STACKEBRANDT et al., 2002) e, atualmente, é mais utilizado na epidemiologia molecular para discriminação em níveis infra-específicos, ou seja, na diferenciação de estirpes da mesma espécie. A análise é realizada a partir da similaridade entre as seqüências nucleotídicas,

onde as diferenças encontradas no pareamento de nucleotídeos caracterizam diferentes alelos e, a partir disso, podemos diferenciar clones dentro de um grupo de estirpes estudado (GEVERS et al., 2005). De acordo com Zeigler (2003) e Thompson et al. (2005), esses genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios como: *i*) estarem no genoma em uma única cópia; *ii*) terem extensão nucleotídica suficiente que permita o seqüenciamento e contenham informações suficientes para as análises; *iii*) que os dados obtidos com o uso destes genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA.

A fim de ser aplicada na taxonomia bacteriana para a definição de espécies e elucidação das relações taxonômicas entre espécies, foi proposta a metodologia de "Multilocus Sequence Analysis" (MLSA), baseada na técnica de MLST (GEVERS et al, 2005; MARTENS et al., 2007). O MLSA utiliza um grupo mais diversificado de estirpes como, por exemplo, um gênero inteiro, e faz o uso de genes que não sejam, necessariamente, "housekeeping", mas que estejam presentes em todos os organismos em análise, e que cumpram os mesmos requisitos do MLST. Na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, sendo utilizados procedimentos de análise filogenética com base na seqüência de nucleotídeos de genes (alelos) que estejam presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família) (GEVERS et al., 2005). Tendo isso como base e, devido ao alto poder de resolução, o MLSA tem permitido a discriminação de estirpes em nível de espécie, onde inicialmente os organismos são identificados em nível de gênero ou família com base no gene ribossomal 16S (GEVERS et al., 2005).

A metodologia de MLSA já foi aplicada, recentemente, em estudos taxonômicos com diferentes gêneros bacterianos, como *Bulkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* e *Ensifer* (GEVERS et al., 2005; THOMPSON et al., 2005; MARTENS et al., 2007).

Estudos filogenéticos realizados, recentemente, dentro de diversos grupos bacterianos, bem como dentro do grupo dos rizóbios, utilizaram genes marcadores filogenéticos alternativos como: *atpD* e *recA* (GAUNT et al., 2001), *glnA* e *glnB* (WERNEGREN; RILEY, 1999; TURNER; YOUNG, 2000; MARTENS et al., 2007), *dnaK* (STEPKOWSKI et al, 2003), *thrC* e *gltA* (HERNÁNDEZ-LUCAS et

al.,2004; MARTENS et. al., 2007). No entanto, a filogenia obtida com base nestes marcadores, nem sempre foi congruente com a filogenia obtida com base no gene ribossomal 16S (MARTENS et. al., 2007).

Atualmente, com a popularização e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática cada vez mais sofisticadas, novos métodos de análises têm sido desenvolvidos a fim de melhorar as análises das relações filogenéticas existentes entre os microrganismos e, com isso, pode-se aproximar, cada vez mais, da história evolutiva entre eles (COENYE et al., 2005; DELSUC et al., 2005; SNEL et al., 2005). Embora as seqüências dos genes ribossomais 16S e a hibridização DNA-DNA continuem sendo consideradas como critérios moleculares para o delineamento de espécies, espera-se que muitas informações taxonômicas adicionais possam ser obtidas a partir de seqüências genômicas completas (COENYE et al., 2005). O conteúdo e ordem gênica, a análise comparativa de seqüências de macromoléculas conservadas, a análise de presença e ausência de genes, a composição de nucleotídeos, bem como a distância filogenética com base no BLAST genômico, são alguns exemplos de métodos recentes baseados na genômica e que podem ser utilizados na taxonomia.

Tendo em vista o grande número de microrganismos que ainda existem para serem identificados e classificados, e o notável avanço das técnicas de biologia molecular, as quais têm gerado uma quantidade consideravelmente grande de dados e permitido um refinamento nas análises taxonômicas, a moderna biossistemática tem adquirido cada vez mais importância dentro da microbiologia.

3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS

O primeiro relato de uma bactéria nodulando uma raiz de planta foi em 1888 por Beijerinck (WILLEMS, 2006). Ele determinou que esses procariotos seriam os responsáveis pelo processo de fixação de nitrogênio e os denominou como *Bacillus radicícola*, nome este que mais tarde foi substituído por *Rhizobium*, com apenas um representante da espécie, *R. leguminosarum* (FRANK, 1889).

Já no início do século 20, os rizóbios foram classificados taxonomicamente, baseados em características fenotípicas, principalmente na

capacidade de nodular algumas leguminosas, e com base neste conceito, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas inicialmente por Fred et al. (1932), como *Rhizobium phaseoli*. Porém, essa concepção foi modificada, devido à observação de reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, onde uma única leguminosa poderia abrigar diferentes bactérias simbiontes, como por exemplo, o feijoeiro, que na classificação atual possui seis espécies distintas nodulando suas raízes (TEREFWORK et al., 2000). Com isso, a classificação das espécies de rizóbios foi posteriormente aprimorada, utilizando as análises de características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (JORDAN 1984). Com base nesse novo conceito, Graham (1964) dividiu as bactérias de crescimento lento e rápido em meio de cultura específico, onde as que possuíam crescimento lento, e que inicialmente eram denominadas de *Rhizobium japonicum*, foram classificadas posteriormente como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982), enquanto as bactérias de crescimento rápido como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Logo em seguida outros cinco gêneros foram incluídos: *Agrobacterium* (COHN, 1942), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1988) e *Allorhizobium* (de LAJUDIE et al., 1998), o qual possui a espécie *Allorhizobium undicola* como única representante da espécie.

Embora constitui um gênero a parte, o *Agrobacterium* ainda possui uma classificação confusa dentro dos rizóbios, pois sua posição filogenética com base no gene ribossomal 16S encontra-se muito próxima ao gênero *Rhizobium* e por isso serão precisos estudos futuros para a sua correta classificação taxonômica (FARRAND et al., 2003). O gênero *Bradyrhizobium* possui atualmente sete espécies: *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. denitrificans*, *B. betae*, *B. canariense* e *B. japonicum*, o qual está presente em inoculantes industriais para utilização em soja (*Glycine*) (WILLENS, 2006).

Em 1988, Chen e colaboradores propuseram o novo gênero *Sinorhizobium*, contendo a espécie *R. fredii*, que a partir de então passaria a ser denominada como *S. fredii*, além da espécie *R. meliloti*, renomeada como *S. meliloti*. Esses mesmos autores propuseram uma segunda espécie para este gênero que foi chamada de *S. xinjiangense*. Por possuírem crescimento rápido, assim como as bactérias do gênero *Rhizobium*, este novo gênero não foi aceito prontamente. Apenas em 1994, a partir de dados filogenéticos como suporte, *Sinorhizobium* foi

aceito como um novo gênero, embora alguns autores tenham proposto a união de todas as espécies de *Sinorhizobium* junto com a espécie *Ensifer adhaerens* dentro de um único gênero, *Ensifer* (MARTENS et al., 2007; YOUNG et al., 2003).

Compreendendo uma faixa intermediária na velocidade de crescimento, e nodulando uma diversidade de leguminosas, estão as bactérias do gênero *Mesorhizobium*, com onze espécies representantes: *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* e *M. thiogangeticum* (WILLENS, 2006).

Além do grupo dos rizóbios, outros gêneros de bactérias têm sido descritas como capazes de realizar a fixação de nitrogênio. Dentre eles estão: *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium* dentro da classe *Alphaproteobacteria* e *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Cupriavidus* dentro das *Betaproteobacteria*.

Desse modo, a classificação atual dos rizóbios é definida como: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alphaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; com a distribuição nas famílias *Bradyrhizobiaceae*, *Hiphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* e *Rhizobiaceae* (GARRITY; HOLT, 2001, NCBI, 2008). A classe *Alphaproteobacteria* é dividida em sete gêneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, classificados através da análise do gene ribossomal 16S, sendo observada uma maior relação entre os três últimos gêneros, onde inclusive, já foi proposto anteriormente que o gênero *Sinorhizobium* seria um subclado dentro do gênero *Rhizobium*, devido a uma íntima ligação entre eles, entretanto, quanto mais seqüências são incluídas para o estudo, mais as espécies de *Sinorhizobium* se apresentam como um grupo monofilético (LLORET; ESPERANÇA, 2005). Em relação às bactérias da classe *Betaproteobacteria*, tem-se a ordem *Burkholderiales* e a família *Burkholderiaceae* para os gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Cupriavidus* (NCBI, 2008).

A Figura 1 apresenta a filogenia dos rizóbios com base no gene ribossomal 16S e de outras bactérias da classe *Alphaproteobacteria*.

Lloret e Esperança (2005), analisando seqüências conservadas e universais de genes parálogos, e as ocorrências de substituição de códons com

troca de aminoácidos em genes ortólogos, propuseram uma escala de tempo, demonstrando a origem e evolução dos rizóbios.

Atualmente, os taxonomistas bacterianos recomendam o uso da taxonomia polifásica para a identificação e classificação dos microrganismos, e a metodologia de análise a ser utilizada vai depender do nível de resolução taxonômica que esta possui, ou seja, desde espécie e gênero, até níveis taxonômicos mais altos, dependendo de fatores como: número de estirpes da espécie em estudo, objetivo do estudo em questão e condições na aplicabilidade da técnica (ZAKHIA; LAJUDIE, 2001). Também com os rizóbios, a taxonomia atual é baseada no gene ribossomal 16S, embora um estudo recente com os gêneros *Ensifer* e *Sinorhizobium* realizado por Martens et al. (2007), tenha demonstrado que a técnica de MLSA, utilizando cinco genes "housekeeping" foi mais apropriada para a classificação dessas bactérias, quando comparada à filogenia com base apenas no gene ribossomal 16S, com uma forte evidência de que esses dois gêneros deveriam se unir em apenas um, conforme proposto anteriormente por Young (2003). Martens et al. (2007) utilizaram os seguintes genes nas análises filogenéticas pela metodologia de MLSA: *dnaK* (heat shock protein) (Stepkowski et al., 2003), *glnA* (glutamina sintetase) (WERNEGREEN; RILEY, 1999; TURNER; YOUNG, 2000), *gltA* (citrate syntase) (Hernández-Lucas et al., 2004J), *recA* (recombinase A) (GAUT et al., 2001) e *thrC* (threonine syntetase), os quais podem ser utilizados em estudos futuros em outros grupos bacterianos, dando suporte para uma tendência na utilização da técnica de MLSA para a filogenia e taxonomia em procariotos.

3.6 TAXONOMIA E FILOGENIA NO GÊNERO *RHIZOBIUM*

Na classificação realizada em 1984, no gênero *Rhizobium* foram incluídas as espécies *R. melioli*, *R. loti* e *R. leguminosarum*, sendo esta última ainda subdividida em três biovars, de acordo com a planta hospedeira: *R. leguminosarum* bv.viciae, que nodula a ervilha, ervilhaca e fava (*Pisum sativum*, *Vicia sativa*, *V. fava*), *R. leguminosarum* bv trifolii, que nodula os trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv phaseoli, que nodula o feijoeiro (JORDAN, 1984).

Com o avanço das técnicas de Biologia Molecular e a identificação de novos isolados de várias regiões do mundo, os rizóbios que nodulam o feijoeiro foram divididos em dois grupos, denominados tipo I e tipo II, devido à observação de características fisiológicas e genéticas distintas. A ausência ou presença de reiteraões (múltiplas cópias) de genes ligados a fixação de N₂, a capacidade de nodular outros hospedeiros e diferenças nos plasmídeos simbióticos (pSym), foram algumas razões para esta divisão (MARTINEZ et al., 1985; QUINTO et al., 1985; BROM et al., 1988).

Em 1991, Martinez-Romero e colaboradores definiram as estirpes do grupo II, como uma nova espécie, que foi denominada de *R. tropici*. Este estudo envolveu a análise parcial do gene ribossomal 16S e hibridização DNA-DNA, onde foi encontrada baixa homologia (36%) e, também, foram encontradas outras diferenças tanto genótípicas como fenotípicas, entre as estirpes deste grupo e as demais espécies descritas. As bactérias dessa nova espécie, *R. tropici*, também apresentavam certa variabilidade, de modo que foram divididas em dois tipos, IIA e IIB, com as estirpes CFN 299 e CIAT 899, respectivamente, determinadas como estirpe de referência para cada um desses tipos, enquanto que a CIAT 899 foi definida como a estirpe tipo ("type strain"). Essa espécie é bem adaptada a solos ácidos e submetidos a altas temperaturas e, também, tem sido encontrada em outros continentes, como na Europa (AMARGER et al., 1994; HERRERA-CERVERA et al., 1999) e na África (ANYANGO et al., 1995). Dois anos depois, Segovia et al. (1993), através de análise da seqüência de nucleotídeos do gene ribossomal 16S, sugeriram que alguns rizóbios isolados de solos americanos (América Central e centros Andinos) e inicialmente classificados como pertencentes ao tipo I, fossem reclassificados em uma nova espécie, *Rhizobium etli*, a qual possui a estirpe CFN 42 como estirpe tipo. Esta nova espécie, juntamente com a espécie de *R. leguminosarum*, inclui as bactérias originalmente classificadas no grupo I, que possuem uma alta correlação, tanto para algumas regiões cromossômicas, quanto para genes contidos no plasmídeo simbiótico, que são homólogos e organizados similarmente (VASQUEZ et al., 1993), indicando a possibilidade de ter ocorrido uma transferência do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum*, quando os primeiros foram introduzidos na Europa (SEGOVIA et al., 1993). Amarger et al. (1997), posteriormente, sugeriram a ocorrência da transferência do plasmídeo

simbiótico de *R. leguminosarum* bv. phaseoli para *R. gallicum* bv. phaseoli e *R. giardinii* bv. phaseoli (AMARGER et al.,1997).

Atualmente, dentro do grupo dos rizóbios que nodulam o feijão (*Phaseolus vulgaris*) estão descritas as seguintes espécies: *R. leguminosarum* bv. phaseoli (JORDAN, 1984), *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al.,1991), *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997). Todas estas espécies, exceto *R. gallicum*, já foram encontradas em solos brasileiros (MOSTASSO et al., 2002).

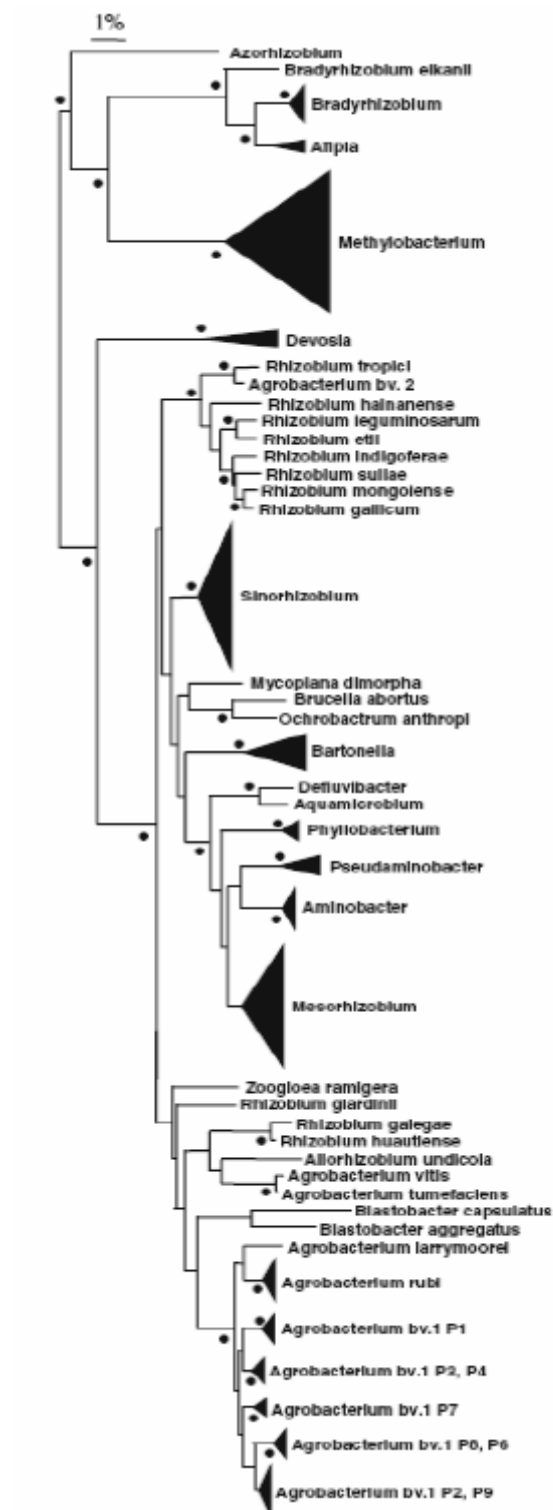


Figura 1 – Filogenia de rizóbios (classe Alphaproteobacteria) com base na sequência do gene ribossômico 16S (WILLENS et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rizhobium tropici* nodulates fiel-grow *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and soil**, 161, 147-156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaesolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 996-1006, 1997.
- ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 91-120, 1994b.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 61, n.11, 4016-4021, 1995.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, S.; D'AVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Enviromental Microbiology**. Washington, 54, 1280-1283, 1988.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 38, 392-397, 1988.
- COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 147-167, 2005.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Feijão total (1^o, 2^a e 3^a safra) - Brasil - Série histórica. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/FeijaoTotalSerieHist.xls>>, acesso em 10 de fevereiro de 2008.
- CONN, H.J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, 44, 353-360, 1942.
- DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; PHILIPPE, H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. **Nature Reviews Genetics**, 6, 361-375, 2005.

DROZDOWICZ, A. Bacterias do solo. In: Vargas, M.A.T. & Hungria, M. (Eds.), *Biologia dos solos do cerrados*. EMBRAPA, **Planaltina**, pp.17-67, 1997.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **Washington**, 38, 89-98, 1988.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Agência de informação - feijão**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/Abertura.html>>, acesso em 10 de fevereiro de 2008.

FARRAND, S.K.; VAN BERKUM, P.B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable member of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 53, 1681-1687, 2003.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges*, 7, 332-346, 1889.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants. Madison, **University of Wisconsin Press**, 343p, 1932.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9th ed., v.1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria 2nd ed. New York: **The Williams & Wilkins, Springer-Verlag**, 119-154, 2001.

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 Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 2037-2048, 2001.

GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (*Fabaceae*) beans. **Economic Botany**, 44, 28-38, 1990.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, 3, 733-739, 2005.

GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal Systematic of Bacteriology**, 45, 274-289, 1995.

GRAHAM, P.H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, 35, 511-517, 1964.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, 36, 1389-1398, 2004.

HARRIS, J.K; KELLEY, S.T; SPIEGELMAN, G.B.; PACE, N.R. The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, 13, 407-412, 2003.

HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M.A.; SEGOVIA, L.; ROJAS-JIMÉNEZ, K.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, 27, 703-706, 2004.

HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H.V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least .five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology** 30, 87-97, 1999.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja. 11-48. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13), 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 189-295, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2, 9-89, 1994.

JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic bacteriology**. 47, 895-898, 1997.

JASPERS E.; OVERMANN, J. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. **Applied and Environmental Microbiology**. 70, 4831-4839, 2004.

JORDAN, D.C.; Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic bacteriology**. 32, 136-139, 1982.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 235-244, 1984.

KAMI, J.; VELASQUEZ, V.B.; DEBOUCK, D.G.; GEPTS, P. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 92, 1101-1104, 1995.

KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (Beans). **Economic Botanic** 19, 358-368, 1965.

KAPLAN, L. What is the origin of the common bean? **Economic Botanic** 35, 240-254, 1980.

KAPLAN, L.; LYNCH, T.F.; SMITH C.E. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from an intermontane peruvian valley. **Science. Whashington**, 179, 66-76, 1973.

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**, 32, 210-220, 2005 b.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48, 369-382, 1998.

LLORET, L.; ROMERO, E.M. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista latinoamericana de Microbiología**, 47, 43-60, 2005.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; VOS, DE P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, 57, 489-503, 2007.

MARTÍNEZ-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 of Systematic Bacteriology** 41, 417-426, 1991.

MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**. London, 131, 1779-1786, 1985.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29, 315-332, 2006.

MORGANTE, P. G., 2003. **Fixação Biológica e Assimilação de Nitrogênio**. Acesso em 04/12/2006. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm>>

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**, 73, 121-132, 2002.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=147700&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>, acesso em 10 de fevereiro de 2008.

QUINTO, C.; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M.A.; PARDO, M.A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M.L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. Washington, 82, 1170-1174, 1985.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 43, 374-377, 1993.

SNEL, B.; MARTIJN, A. H.; DUTILH, B. E. Genome trees and the nature of genome evolution. **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.191-209, 2005.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMAN, W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 1043-1047, 2002.

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The Variable Part of the *dnaK* Gene as an Alternative Marker for Phylogenetic Studies of Rhizobia and Related Alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, 26, 483-494, 2003.

SULLIVAN, J. T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology** 62, 2818-2825, 1996.

TEREFEWOR, Z.; LORTET, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTROM, K. Molecular Evolution of Interactions Between Rhizobia and Their Legume Hosts. 187-206, cap 13. In: Prokaryotic Nitrogen Fixation A Model System for Analysis of a Biological Process. **Horizon Scientific Press**, Wymondham, UK, 2000.

TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTROM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48, 349-356, 1998.

THOMPSON, F.L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C.B.; SWINGS, J. Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 5107-5115, 2005.

- TURNER, S.L.; YOUNG, J.P.W. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. **Molecular Biology and Evolution**, 17, 309-319, 2000.
- VAN BERKUM, P., TEREFWORK, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology** 185, 2988-2998, 2003.
- VANDAMME, T.; POT, B.; GILLIS, M; VOS, DE P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, 60, 407-438, 1996.
- VASQUEZ, M., DAVALOS, A., DE LAS PENAS, A., SANCHEZ, F., AND QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. **Journal of Bacteriology**. 173, 1250-1258, 1991.
- VELASQUEZ, Y.A; KLUSON, R.A; SCRÖDER, E.C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**. Rio Piedrs, 72, 373-382, 1992.
- VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. **Systematic and applied microbiology** 28, 702-716, 2005.
- WERNEGREEN, J.J.; RILEY, M.A. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology and Evolution**, 16, 98-113, 1999.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and soil**, 287, 3-14, 2006.
- WOESE, C.R.; GEORGE, E.F. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, 74, 5088-5090, 1977.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87, 4576-4579, 1990.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 89-103, 2001.

YOUNG, J.M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 2107-2110, 2003.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, de P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, 25, 569-576, 2001.

ZEIGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 1893-1900, 2003.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of theoretical biology**, 8, 357-366, 1965.

Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity

Renan Augusto Ribeiro^{a,b,c}, Fernando Gomes Barcellos^{a,b,d}, Fabiano L. Thompson^e,
Mariangela Hungria^{a,b,c,*}

^aEmbrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil; E-mail: renanribeiro83@hotmail.com; fgbarcel@yahoo.com.br; hungria@cnpso.embrapa.br

^bUniversidade Estadual de Londrina, Dept. of Microbiology, Cx. Postal 60001, 86051-990, Londrina

^cConselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-MCT), Brasília, Federal District, Brazil

^dCoordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília

^eUFRJ, Center of Health Sciences, Institute of Biology, Cx. Postal 68011, 21944-970, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; E-mail: fabiano.thompson@biologia.ufrj.br

*author for correspondence

Abstract

The diazotrophic bacteria that are collectively known as "rhizobia" are important for establishing symbiotic N₂-fixing associations with many legumes. These microbes have been used for over a century as an environmentally beneficial and cost-effective means of ensuring acceptable yields of agricultural legumes. The most widely used phylogenetic marker for identification and classification of rhizobia has been the 16S rRNA gene; however, this marker fails to discriminate some closely related species. In this study we have established the first multilocus sequence analysis (MLSA) scheme for the identification and classification of rhizobial microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). We have analyzed eighteen strains, including type strains and representatives of the biodiversity present in Brazilian soils, by means of sequencing *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII* and *rpoA* genes. Gene sequence similarities among the five type strains ranged from 95 to 100% for the 16S rRNA, and from 83 to 99% for the other five genes. Rhizobial species described as symbionts of common bean have also formed separated groups on the analysis of single and concatenated gene sequences, and clusters formed in each tree were in good mutual agreement. The five additional loci may thus be considered as useful markers for the genus *Rhizobium*, and will allow

underpinning the online identification of rhizobial isolates. The MLSA also revealed broad genetic diversity among strains classified as *R. tropici*, providing evidence of new species.

Key words: Biological nitrogen fixation; common beans; multilocus sequence analysis; phylogeny of bacteria; *Rhizobium tropici*; 16S rRNA gene

Introduction

The diazotrophic bacteria that are collectively known as "rhizobia" are capable of nodulating and establishing symbiotic N₂-fixing associations with many plant species of the Leguminosae family. Based on polyphasic analyses of phenetic and genetic properties, rhizobia are currently categorized in six genera—*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* and *Rhizobium* [18, 37, 65]. Nevertheless, taxonomic changes have been proposed: first, as the phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene shows that *Rhizobium*, *Agrobacterium* and *Allorhizobium* are closely related, they should be joined into a single genus, *Rhizobium* [72] second, all *Sinorhizobium* species should be reclassified into the genus *Ensifer* [71]. In addition, some diazotrophic symbiotic bacteria isolated in recent years have been classified in non-traditional rhizobial genera, included in both the alpha-Proteobacteria—*Methylobacterium*, *Devosia*—and in the beta-Proteobacteria—*Burkholderia*, *Waltersia* (formerly *Ralstonia*)—classes [18, 37, 65].

The usefulness of the 16S rRNA gene as a molecular marker for assessing phylogeny and taxonomy of prokaryotes has been broadly demonstrated [18, 27, 61, 64, 68, 69, 70], and the gene has also been applied for rhizobial taxonomy [18, 37, 65, 66, 73, 74]. However, the high level of conservation documented in the 16S rRNA [21, 22, 42, 63, 67], and reports that genetic recombination and horizontal gene transfer may also occur among 16S rRNA genes [22, 60] suggest that this marker has shortcomings. On the basis of these observations, as well as to minimize their effects, other genes with a faster evolution rate than the 16S rRNA, but conserved enough to retain genetic information, have been proposed as alternative phylogenetic markers [38, 52, 53]. Requisites are that these genes should be both broadly distributed among taxa and also

be present in single copies within a given genome, and the current consensus is that at least five genes are necessary for reliable taxonomic classification [22, 52, 57, 75]. Applying this approach to bacterial taxonomy and elucidation of phylogenetic relationships, the multilocus sequence analysis (MLSA)—using sequences of multiple protein-coding genes for the genotypic characterization of diverse groups of prokaryotes—has been proposed [22]. MLSA has been applied in studies with several genera of prokaryotes, including *Burkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* and *Ensifer* [22, 38, 57]. Expectations are that these analyses will add force to the online electronic taxonomy of bacteria and will have a positive impact how we perform taxonomic and biodiversity studies [58].

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) represents the most important source of protein for low-income populations in Latin America and in Africa, and Brazil is its largest producer and consumer worldwide [13]. It is generally accepted that there are two major centers of genetic diversification of common bean, the Mesoamerican (Mexico, Colombia, Ecuador and north of Peru, probably the primary center), and the Andean (southern Peru to north of Argentina). Although wild relatives of common beans are not indigenous to Brazil, it has been cultivated there throughout recorded history [11, 17, 20, 32, 33]. The symbionts of common bean were first classified as *Rhizobium phaseoli*, based on the cross-inoculation-group concept [16]. In 1984, with a numerical taxonomy approach, they were reclassified into a new species, *R. leguminosarum*, which contains three biovars, named after their main host species—bv. *viciae* (*Pisum sativum*), bv. *trifolii* (*Trifolium* spp.) and bv. *phaseoli* (common bean) [31]. Advances in molecular biology technology as well as isolation of new strains from various parts of the world, led to the description of several differences among common-bean rhizobia, such that they were pooled into two main groups, denominated type I and type II [9, 39, 40, 47]. In 1991, a new species, *R. tropici*, was described for the type-II strains, with two subgroups, type IIA and type IIB [41]. Segovia *et al.* [49] then proposed that some rhizobia isolated from American soils and initially classified as type I should be reclassified into the new species *R. etli*, and two new species, *R. gallicum* and *R. giardinii*, were described by Amarger *et al.* [5], the latter forming non-N₂-fixing nodules.

Common bean is promiscuous in its symbiotic relationships [44] and its widespread and long-term cultivation in Brazil probably explains the large and diverse populations of its rhizobial symbionts detected in surveys. All described species have been found, except for *R. gallicum*, as well as species of *Mesorhizobium* and *Ensifer* (*Sinorhizobium*) and putative new species [23, 25, 26, 28, 29, 30, 45, 46, 55]. However, despite the social-economic importance of the legume in Brazil and the broad diversity of the rhizobial population, taxonomic and phylogenetic knowledge of the indigenous isolates remains limited. The development of MLSA presents an opportunity to establish the basis of an online taxonomic scheme for the identification of rhizobia in general, and to determine the phylogenetic relationships among common-bean rhizobia, with emphasis on strains of *R. tropici* indigenous to Brazil.

Material and methods

Strains, culture conditions and DNA extraction

A total of eighteen common-bean rhizobial strains were used in this study, twelve indigenous to Brazil (detailed information given on Table 1), and six type and reference strains, as follows: *Rhizobium tropici* strain CIAT 899^T (type B) (=USDA 9030; =ATCC 49672; =UMR1899; =TAL 1797; =HAMBI 1163; =CM01; =SEMIA 4077; DSM 11418; BR 322), *Rhizobium tropici* type A strain CFN 299 (=USDA 9039; =LMG 9517; =UMR1026; =CENA 183), and *R. etli* bv. *phaseoli* strain CFN 42^T (=USDA 9032; ATCC 51251; DSM 11541) were supplied by Dr. Esperanza Martinez-Romero (Centro de Ciencias Genomicas, Cuernavaca, Mexico). *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671 (=RCR 3644) was provided by Dr. Peter van Berkum (USDA, Beltsville, Maryland, USA). *R. giardinii* bv. *giardinii* strain H152^T (=USDA 2914) and *R. gallicum* bv. *gallicum* strain R602sp^T (=USDA 2918) were provided by Dr. Noelle Amarger (INRA, Dijon, France). Strains were purified on yeast extract-mannitol agar (YMA) medium [62] containing Congo red (0.00125%), stocks were prepared on YMA and kept at -70°C (under 30% of glycerol) for long-term storage and at 4°C as source cultures.

Total genomic DNA of each strain was extracted from bacterial batch cultures grown in YM broth until late exponential phase (10^9 cells mL⁻¹). Extraction of DNA was performed as described before [34], and purification and maintenance of stocks were as described by Menna et al. [42].

Genes and primers of the multilocus sequence analysis (MLSA)

In addition to the 16S rRNA, the following genes were used in this study: *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII* and *rpoA*. Primers for the amplification of the genes 16S rRNA, *recA*, *dnaK*, *gltA* and *glnII* were obtained from the literature and are listed on Table 2. Considering the chromosome of *R. etli* (4,381,608 pb), the complementary genes were positioned as follows (5'-3' direction): 2422674 (*recA*), 153088 (*dnaK*), 2007997 (*gltA*), 3250540 (*glnII*), and 1781361 (*rpoA*).

To design primers for the amplification and sequencing of the *rpoA* gene, corresponding sequences derived from the following complete genome sequences were used (accession numbers of the GenBank Data Library in parentheses): *R. etli* strain CFN 42 (CP000133), *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841 (AM236080), chromosome of *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* strain 1021 (AL591787), and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* strain WSM419 (CP000738). The sequences obtained were compared using the program CLUSTALX [59] to identify conserved regions and the designed primers were named RR*rpoA* (Table 2). The approximate size of each gene and the size of the amplified fragments are also listed on Table 2.

To obtain the complete sequence of the 16S rRNA, five reactions were carried out as described before [42], whereas, for the other genes, only two reactions were needed (forward and reverse). Each reaction contained, in a volume of 50 μ L: dNTPs (300 μ M of each); PCR-buffer (Tris-base 20 mM pH 8.4 and KCl 50 mM); primers (15 pmol of each); Taq DNA polymerase (1.0 U); DNA (20 ng). The conditions of PCR amplification were as described before for the following genes: 16S rRNA [42], *dnaK* [53], *recA* [19], *gltA* [38], and *glnII* [54]. For the PCR amplification of the *rpoA* gene, an initial cycle of denaturation at 95°C for 2 min was followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s, and extension at 72°C for 2

min; the amplification finished with a final extension cycle of 72°C for 5 min. All PCR reactions were carried out on an MJ Research Inc. PTC 200 thermocycler. For purification of the PCR-products, the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) was used, according to the manufacturer's instructions. Sample concentration was verified by electrophoresis of 2-uL PCR products on a 1% agarose gel and staining with ethidium bromide.

The sequencing reactions were carried out in 96-well-full-skirt-PCR microplates. Purified PCR products of each bacterium culture (80 ng per reaction) received a mixture of 3 uL of dye (DYEnamic ET terminator reagent premix for the MegaBACE, Amersham Biosciences), and 3 pmol of each primer. The same program was used for all primers, as follows: denaturation at 95°C for 2 min; thirty cycles of denaturation at 95°C for 10 s, 50°C for 4 s, and extension at 60°C for 4 min; final soak at 4°C. The sequencing was performed on a MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences) capillary sequencer, according to the manufacturer's instructions.

High-quality sequences obtained for each strain were assembled into contigs using the programs Phred [14], Phrap (www.phrap.org) and Consed [24]. Sequences confirmed in the 3' and 5' directions were submitted to the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to seek significant alignments. Accession numbers given to the genes are listed on Table 3.

Phylogenetic analysis

Multiple alignments for each gene were performed with CLUSTALX version 1.83 [59]. Sequences (accession numbers of the GenBank Data Library in parentheses) obtained from the complete genomes of *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* strain WSM419 (CP000738), *Rhizobium (Agrobacterium) tumefaciens* strain C58 (AE007869), and *E. meliloti* strain 1021 (AL591787) were included in the analysis and those obtained from *Caulobacter crescentus* strain CB15 (AE005673) were used as outgroups. Phylogenetic trees were generated using MEGA version 3.1 [36] with default parameters, K2P distance model [35], and the Neighbor-Joining algorithm [48]. Parsimony-informative characters were also estimated in the MEGA program. Statistic support for tree nodes was evaluated by bootstrap analyses [15] with 1,000 samplings.

Congruencies among each gene and the concatenated genes were also analyzed using the UPGMA algorithm (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) [50] with the Bionumerics program (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 4.6).

Results and discussion

We have used the MLSA approach to analyze twelve common-bean rhizobia indigenous to Brazil, chosen to represent large groups of similar strains and selected from a collection of over 850 isolates obtained from thirty-three states in three regions of the country: the northeast (close to Ecuador, high temperatures, low-fertility soils), the Cerrados (savannah, acidic soils, high temperatures and a yearly dry season of about 7 months), and the southern (milder temperatures and more-fertile soils) regions [25, 28, 45, 46]. In addition to the 16S rRNA, the genes chosen for the MLSA were *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII* and *rpoA*, as they conformed to requirements established for the technique, i.e., single copies of each in the chromosome and evenly distributed in the genome [22, 52, 57, 75].

The genes showing proportionally better parsimony-informative characters were *recA* (26%) and *dnaK* (27%), while *glnII* (139 pb) and *gltA* (135 pb) had the highest numbers of informative sites. Neighbour-joining (NJ) trees were built for each gene (Fig. 1), as well as for the concatenated sequences of all six genes (Fig. 2). The five type strains had 83 to 99%, 78 to 91%, 86 to 94%, 89 to 97%, 85 to 91%, and 92 to 99% gene-sequence similarities for *recA*, *dnaK*, *glnII*, *rpoA* and *gltA*, respectively; the estimated percentage for the 16S rRNA ranged from 95 to 100%, thus indicating that the five additional locus studied can be considered as useful alternative markers for the genus *Rhizobium* and related genera.

The strains clearly formed separated clusters in each gene tree, except for some differences in the analyses of *gltA* (Fig. 1). High congruences between the genes were shown in the correlation analysis (Fig 3), and the groupings obtained in each of the trees were in agreement (Figs 1, 2).

Strains within group I formed a separated clade, including *R. tropici* strains, with high bootstrap values (74-100%) in the trees built with each of the six genes (Fig. 1), as well as with the concatenated genes (Fig. 2). Within this group, the highest similarity

with the 16S rRNA gene (estimated in the MEGA program) occurred with *rpoA*, ranging from 95 to 100%, but high values were also obtained for *recA*, *gltA*, *dnaK* and *glnII*, with similarities estimated at 91 to 99%, 89 to 100%, 89 to 100% and 91 to 100%, respectively.

Within the *R. tropici* group, in all trees except with *gltA*, three clear subgroups were formed (Fig. 1), and were confirmed with a bootstrap of 100% on the concatenated tree (Fig. 2). The subgroups can be described as follows: the first (IA) included strains 77, CPAO 29.8 and CFN 299 (*R. tropici* type A); the second (IB) included strains PRF 35 and H 52; and the third (IC) included strains H 20, H 12 and CIAT 899^T (*R. tropici* type B). Two other Brazilian strains, PRF 81 (=SEMIA 4080)—effective in fixing N₂ and officially recommended for the production of commercial inoculants in Brazil [28, 29] and strain 233 were either in a separated subcluster, or were linked to the subcluster of type-B strains, and in general were responsible for lowering the bootstrap values of the trees. Therefore, a main conclusion from our study is that, except for H 12 and H 20, the Brazilian strains classified currently as *R. tropici*—on the basis of phenetic properties, host range and 16S rRNA sequences—are considerably different from CIAT 899^T, and represent putative new species

R. etli and *R. leguminosarum* strains were clustered together in all trees except for the *dnaK* gene (Fig 1), with a good bootstrap support (100%) on the concatenated tree. The two other common-bean species, *R. gallicum* and *R. giardinii*, were not clustered with any of the other strains in this study, in any of the trees (Figs. 1 and 2).

Except for the tree with the *recA* gene, a strongly supported monophyletic group (99-100% of bootstrap) was formed with strains 72, 74, 209 and *E. meliloti* and *E. medicae*. Considering both BLASTn and the similarities of nucleotides, stronger similarities for all genes (99 to 100%) of those three Brazilian strains were observed with *Ensifer (Sinorhizobium) fredii*, but this species was not used in the MLSA, because there were no available sequences for all these genes in the database. Phenetic and genetic properties have indicated that strains of *Ensifer (Sinorhizobium)* strains serve as microsymbionts of common bean in Brazil [25, 56].

Evolutionary aspects related to *R. tropici*, *R. etli* and *R. leguminosarum* in Brazil

The origin of *R. tropici* was first suggested as being South America [41] with Brazil a strong candidate, representing the source of the great majority of strains isolated so far [6, 25, 28, 30, 43, 45, 46, 55, 56]. Another hypothesis is that *R. tropici* came from the Andean region (CIAT 899 was isolated in Colombia) and adapted well to Brazilian soils and environmental conditions. The presence of *R. tropici* nodulating leguminous plants in Europe and Africa [4, 7] could be explained by migration via trade. However, as wild bean is not found in Brazil [11, 17], *R. tropici* could be a microsymbiont of other indigenous host legumes. Possible candidates are species of the genera *Mimosa* and *Gliricidia*, reported to establish effective symbioses with *R. tropici* under field conditions [42]. However, *R. tropici* has also been reported as being a microsymbiont of legumes indigenous to Mexico (*Gliricidia*) [1] and Africa (*Bolusanthus* and *Spartium*) [10]; however, information on ranges of distribution of *R. tropici* is missing from those studies. Therefore, the evidence that *R. tropici* is indigenous to Brazil is strong but not conclusive, and a main conclusion arising from our results is that the broad diversity within the strains classified currently as *R. tropici* indicates new species.

R. etli is the dominant microsymbiont in both the Mesoamerican and the Andean centers of origin. It is also the predominant symbiont of wild beans in Northwest Argentina [2, 3, 8, 49]. Segovia *et al.* [49] proposed that when seeds containing *R. etli* bv. phaseoli were introduced to Europe, the symbiotic plasmid could have been transferred to *R. leguminosarum*; later, the same process may have occurred from *R. leguminosarum* bv. phaseoli to *R. gallicum* bv. phaseoli and *R. giardinii* bv. phaseoli [5]. Although Brazil is not a center of genetic diversification of common bean, *R. etli* is also found in Brazilian soils [25, 26, 55], possibly a result of cultivation of the legume for centuries. But, most interestingly, *R. leguminosarum* is also broadly found in Brazilian soils [6, 23, 45, 51], and was detected in Colombia [12] suggested as a third center of genetic diversification of common bean [20] raising the possibility that *R. leguminosarum* is not of European origin.

Concluding remarks

Broad genetic diversity was observed among common-bean rhizobial strains indigenous to Brazilian soils, and the MLSA method effectively established phylogenetic relationships with type and reference strains. As has been suggested for other species [38], MLSA is clearly a valuable alternative to 16S rRNA sequence analysis and DNA-DNA hybridization for elucidation of the taxonomy of rhizobia. Strains classified today as *R. tropici* are found in abundance in a variety of Brazilian acid soils and are probably the most important tropical microsymbionts of common bean due to their genetic stability, effectiveness in fixing N₂ and tolerance of environmental stresses [28, 29]. In addition, the genetic diversity reported in this study gives strong support to the suggestion that many strains classified today as *R. tropici* might fit into new species. Polyphasic taxonomic work is under way in our laboratory in order to confirm this hypothesis.

Acknowledgments

The work was partially supported by CNPq/MCT, projects Culture Collections (552393/2005-3), Millennium Institute, PROTAX (563960/05-1), and Research Productivity (300698/2007-0). F.L. Thompson thanks grants of CNPq, IFS, and FAPERJ. The authors thank Ligia M.O. Chueire, Pamela Menna and Jesiane S.S. Batista (Embrapa Soja) for assistance in several steps of this work and Allan R.J. Eaglesham for helpful discussion of the manuscript.

References

- [1] C. Acosta-Durán, E. Martínez-Romero, Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Arch. Microbiol. 178 (2002) 161-164.
- [2] O.M. Aguilar, M.V. López, P.M. Riccillo, R.A. González, M. Pagano, D.H. Grasso, A. Pühler, G. Favelukes, Prevalence of the *Rhizobium-etli* like allele in genes

- coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3520-3524.
- [3] O.M. Aguilar, O. Riva, E. Peltzer, Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 13548-13553.
- [4] N. Amarger, M. Bours, F. Revoy, M.R. Allard, G. Laguerre, *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* 161 (1994) 147-156.
- [5] N. Amarger, V. Macheret, G. Laguerre, *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 996-1006.
- [6] D.S. Andrade, P.J. Murphy, K.E. Giller, The diversity of Phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 4025-4034.
- [7] B. Anyango, K.J. Wilson, J.L. Beynon, K.E. Giller, Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 4016-4021.
- [8] G. Bernal, P.H. Graham, Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 47 (2001) 526-534.
- [9] S. Brom, E. Martínez, G. D'Avila, R. Palácios, Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 1280-1283.
- [10] H. Dagut, P.L. Steyn, Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils, In: I.A. Tikhnovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (Eds.), *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Boston: Kluwer, Boston, 1995, pp. 683-686.
- [11] D.G. Debouck, Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers? *Plant. Gen. Res. Newsl.* 67 (1986) 2-8.

- [12] B.D. Eardly, F.S. Wang, T.S. Whittam, R.K. Selander, Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 507-512.
- [13] Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2006. Agência de Informação - Feijão. From <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/Abertura.html>
- [14] B. Ewing, L. Hillier, M.C. Wendl, P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8 (1998) 175-185.
- [15] J. Felsenstein, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (1985) 783-791.
- [16] E.B. Fred, I.L. Baldwin, E. McCoy, Root Nodule Bacteria of Leguminous Plant. Madison, WI: University of Wisconsin Press, 1932.
- [17] F.O. Freitas, Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 41 (2006) 1199-1203.
- [18] G.M. Garrity, J.G. Holt, The road map to the Manual, In: D.R. Boone, R.W. Castenholz, G.M. Garrity (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol. 1, Springer, New York, 2001, pp. 119-166.
- [19] M.W. Gaunt, S.L. Turner, L. Rigottier-Gois, S.A. Lloyd-Macgilp, J.P. Young, Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 2037-2048.
- [20] P. Gepts, D. Debouck, Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), In: A. van Schoonhoven, O. Voysest (Eds.), *Common Beans: Research for Crop Improvement*, Wallingford-UK, Cali-Colombia, CAB, 1991, pp. 753.
- [21] M.G. Germano, P. Menna, F.L. Mostasso, M. Hungria, RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006) 217-229.
- [22] D. Gevers, F.M. Cohan, J.G. Lawrence, B.G. Spratt, T. Coenye, E.J. Feil, E. Stackebrandt, Y.V. de Peer, P. Vandamme, F.L. Thompson, J. Swings, Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* 3 (2005) 733-739.

- [23] A. Giongo, L.M.P. Passaglia, J.R.J. Freire, E.L.S. Sä, Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils*. 43 (2007) 593-598.
- [24] D. Gordon, C. Abajian, P. Green, Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*. 8 (1998) 195-202.
- [25] L. Grange, M. Hungria, Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil. Biol. Biochem*. 36 (2004) 1389-1398.
- [26] L. Grange, M. Hungria, P.H. Graham, E. Martinez-Romero, New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil. Biol. Biochem*. 39 (2007) 867-876.
- [27] J.K. Harris, S.T. Kelley, G.B. Spiegelman, N.R. Pace, The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res*. 13 (2003) 407-412.
- [28] M. Hungria, D.S. Andrade, L.M.O. Chueire, A. Probanza, F.J. Guitierrez-Manero, M. Megias, Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem*. 21 (2000) 1515-1528.
- [29] M. Hungria, R.J. Campo, I.C. Mendes, Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils*. 39 (2003) 88-93.
- [30] M. Hungria, A.A. Franco, J.I. Sprent, New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 149 (1993) 103-109.
- [31] D.C. Jordan, Family III, Rhizobiaceae Conn 1938, In: N.R. Krieg, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkens Co, Baltimore, USA, 1984, pp. 234-235.
- [32] L. Kaplan, Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). *Econ. Bot.* 19 (1965) 358-368.
- [33] L. Kaplan, What is the origin of the common bean? *Econ. Bot.* 35 (1980) 240-254.
- [34] G. Kaschuk, M. Hungria, D.S. Andrade, R.J. Campo, Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl. Soil. Ecol.* 32 (2006) 210-220.

- [35] M. Kimura, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 (1980) 111-120.
- [36] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* 5 (2004) 150-163.
- [37] L. Lloret, E. Martínez-Romero, Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47 (2005) 43-60.
- [38] M. Martens, M. Delaere, R. Coopman, P. de Vos, M. Gillis, A. Willems, Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 489-503.
- [39] E. Martínez, R. Palácios, F. Sánchez, Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169 (1987) 2828-2834.
- [40] E. Martínez, M.A. Pardo, R. Palacios, M.A. Cevallos, Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985) 1779-1786.
- [41] E. Martínez-Romero, L. Segovia, F.M. Mercante, A.A. Franco, P. Graham, M.A. Pardo, *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 417-426.
- [42] P. Menna, M. Hungria, F.G. Barcellos, E.V. Bangel, P.N. Hess, E. Martínez-Romero, Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (2006) 315-332.
- [43] F.M. Mercante, C.O. Cunha, R. Straliootto, W.Q. Ribeiro-Junior, J. Vanderleyden, A.A. Franco, *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "cerrado" region. *Rev. Microbiol.* 29 (1998) 49-58.
- [44] J. Michiels, B. Dombrecht, N. Vermeiren, C. Xi, E. Luyten, J. Vanderleyden, *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26 (1998) 193-205.

- [45] L. Mostasso, F.L. Mostasso, B.G. Dias, M.A.T. Vargas, M. Hungria, Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field. Crops. Res.* 73 (2002) 261-272.
- [46] F.G.S. Pinto, M. Hungria, F.M. Mercante, Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 1851-1864.
- [47] C. Quinto, M. Flores, J. Leemans, M.A Cevallos, M.A. Pardo, R. Azpiroz, M.L. Girard, E. Calva, R. Palacios, Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobiumphaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1170-1174.
- [48] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406-425.
- [49] L. Segovia, J.P.W. Young, E. Martínez-Romero, Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 374-377.
- [50] P.H.A. Sneath, R.R. Sokal, *Numerical Taxonomy*, San Francisco, W. H. Freeman & Co, 1973.
- [51] A.L.L. Soares, P.A.A. Ferreira, J.P.A.R. Pereira, H.M.M. Vale, A.S. Lima, M.J.B. Andrade, F.M.S. Moreira, Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG) II - Feijoeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 30 (2006) 803-811.
- [52] E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G.M. Garrity, P.A.D. Grimont, P. Kampfer, M.C.J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H.G. Truper, L. Vauterin, A.C. Ward, W.B. Whitman, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 1043-1047.
- [53] T. Stepkowski, M. Czaplinska, K. Miedzinska, L. Moulin, The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (2003) 483-494.
- [54] T. Stepkowski, L. Moulin, A. Krzyżañska, A. McInnes, I.J. Law, J. Howieson, European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in

- soils of western Australia and south Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 7041-7052.
- [55] P. Stocco, J.C.P. Santos, V.P. Vargas, M. Hungria, Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 31 (2008) 1-9.
- [56] R. Stralio, C.O. Cunha, F.M. Mercante, A.A. Franco, N.G. Rumjanek, Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 71 (1999) 3-11.
- [57] F.L. Thompson, D. Gevers, C.C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C.B. Munn, J. Swings, Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 5107-5115.
- [58] F.L. Thompson, J. Swings, Taxonomy of Vibrios. In: F.L. Thompson, B. Austin, J. Swings (Eds.), *The Biology of Vibrios*, ASM Press, Washington D.C., 2006.
- [59] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25 (1997) 4876-4882.
- [60] P. van Berkum, Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindström, B.D. Eardly, Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185 (2003) 2988-2998.
- [61] P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings, Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 407-438.
- [62] J.M. Vincent, *Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 1970 (IBP Handbook No. 15).
- [63] P. Vinuesa, M. Leon-Barrios, C. Silva, A. Willems, A. Jarabo-Lorenzo, R. Perez-Galdona, D. Werner, E. Martinez-Romero, *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (2005) 569-75.

- [64] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 697-703.
- [65] A. Willems, The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287 (2006) 3-14.
- [66] A. Willems, D. Collins, Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 305-313.
- [67] A. Willems, R. Coopman, M. Gillis, Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 623-632.
- [68] C.R. Woese, Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 (1987) 221-271.
- [69] C.R. Woese, E.F. George, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5088-5090.
- [70] C.R. Woese, O. Kandler, M.L. Wheelis, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 4576-4579.
- [71] J.M. Young, The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems *et al.* 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 2107-10.
- [72] J.M. Young, L.D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, H. Sawada, A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998, as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 89-103.
- [73] J.P.W. Young, Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives, In: R. Palacios, J. Mora, W.E. Newton (Eds.), *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 587-592.
- [74] J.P.W. Young, H.L. Downer, B.D. Eardly, Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 2271-2277.

- [75] D.R. Zeigler, Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 1893-1900.

List of Figures

Fig. 1. Phylogenetic tree based on the *dnaK*, *glnll*, *gltA*, *recA*, *rpoA* and 16S rRNA sequences of Brazilian indigenous and type/reference strains of common bean rhizobia. Accession numbers are described on the material and methods section and on Table 3, and *Caulobacter crescentus* was used as an outgroup strain. The tree was generated using MEGA version 3.1 with default parameters, K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the concatenated genes *dnaK* + *glnll* + *gltA* + *recA* + *rpoA* + 16S rRNA. Strains and accession numbers are as described for Fig. 1. The tree was generated using MEGA version 3.1 with default parameters, K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm.

Fig. 3. Congruence of the trees using single or concatenated genes of twelve indigenous Brazilian rhizobial strains, and reference and type strains of common bean rhizobia, as described in Fig. 1. Congruence was estimated using the Bionumerics program, with the UPGMA algorithm.

Table 1 – Strains used in this study.

Strain	Geographic origin*	Reference	Species name
<u>Type/reference strains</u>			
CFN 299	Brazil	[41]	<i>Rhizobium tropici</i> type A
CIAT 899 ^T	Colombia	[41]	<i>R. tropici</i> type B
USDA 2671	USA	Dr. P. van Berkum (USDA)	<i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli
CFN 42 ^T	Mexico	[49]	<i>R. etli</i> bv. phaseoli
R602 ^T	France	[5]	<i>R. gallicum</i> bv. gallicum
H152 ^T	France	[5]	<i>R. giardinii</i> bv. giardinii
<u>Brazilian indigenous strains</u>			
H 12	Planaltina (DF, Cerrados)	[45]	<i>R. tropici</i>
H 20	Planaltina, (DF, Cerrados)	[45]	<i>R. tropici</i>
H 52	Planaltina, (DF, Cerrados)	[45]	<i>R. tropici</i>
72	Sto Antonio (PE, northeast)	[25]	not well defined
74	Sto Antonio (PE, northeast)	[25]	not well defined
77	Sto Antonio (PE, northeast)	[25]	not well defined
206	Francisco Alves (PR, southern)	[25]	not well defined
209	Francisco Alves (PR, southern)	[25]	not well defined
233	Francisco Alves (PR, southern)	[25]	<i>R. tropici</i>
PRF 35	Pitanga (PR, southern)	[28]	<i>R. tropici</i>
PRF 81	Londrina (PR, southern)	[28]	<i>R. tropici</i>
CPAO 29.8	Dois Irmãos do Buriti (MS, Cerrados)	[46]	<i>R. tropici</i>

*In Brazil, listed as District (State, Region).

Table 2 – Primers used for the PCR amplification and sequencing analysis of the DNA.

Gene size (≈bp)	Primer	Sequence (5' - 3')	Size (bp)*	Reference
16S rRNA (1,500)	fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,422	[64]
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		[74]
	362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG		[42]
	786f	CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGG		[42]
	rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC		[64]
<i>dnaK</i> (1,900)	dnaK1466F	AAGGARCANCAGATCCGCATCCA	305	[53]
	dnaK1777R	TASATSGCCTSRCCRAGCTTCAT		
<i>recA</i> (1,090)	recA6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	498	[19]
	recA555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT		
<i>gltA</i> (1,290)	gltA428F	CSGCCTTCTAYCAYGACTC	644	[38]
	gltA1111R	GGGAGCCSAKCGCCTTCAG		
<i>glnII</i> (1,040)	TSglnII _f	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	1,041	[54]
	TSglnII _r	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCC		
<i>rpoA</i> (1,010)	RRrpoAf	GGAAATCGCCATCAAGATGG	637	this study
	RRrpoAr	GGAAATCGCCATCAAGATGG		

*Size used in this study, considering only the complete aligned sequences.

Table 3 – GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences obtained in this study.

Strain	16S rRNA	<i>dnaK</i>	<i>recA</i>	<i>gltA</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoA</i>
CFN 299	EU488741	EU488773	EU488817	EU488806	EU488777	EU488845
CIAT 899 ^T	EU488752	EU488764	EU488815	EU488803	EU488791	EU488833
USDA2671	EU488755	EU488763	EU488811	EU488800	EU488784	EU488837
CFN 42 ^T	EU488751	EU488768	EU488824	EU488809	EU488776	EU488844
R602 ^T	EU488748	EU488772	EU488823	EU488805	EU488785	EU488840
H152 ^T	EU488750	EU488769	EU488819	EU488793	EU488778	EU488829
H 12	EU488743	EU488760	EU488814	EU488804	EU488788	EU488838
H 20	EU488740	EU488759	EU488816	EU488799	EU488792	EU488839
H 52	EU488756	EU488765	EU488828	EU488808	EU488775	EU488834
72	EU488754	EU488767	EU488818	EU488810	EU488783	EU488830
74	EU488746	EU488766	EU488825	EU488807	EU488790	EU488832
77	EU488745	EU488771	EU488813	EU488795	EU488786	EU488831
206	EU488744	EU488774	EU488822	EU488794	EU488782	EU488846
209	EU488747	EU488770	EU488820	EU488796	EU488779	EU488835
233	EU488749	EU488758	EU488821	EU488797	EU488780	EU488841
PRF 35	EU488753	EU488761	EU488826	EU488801	EU488787	EU488842
PRF 81	EU488742	EU488762	EU488827	EU488802	EU488789	EU488836
CPAO 29.8	EU488739	EU488757	EU488812	EU488798	EU488781	EU488843