



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAKELINE RENATA MARÇON DELAMUTA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESTIRPES DE
BRADYRHIZOBIUM UTILIZADAS EM INOCULANTES
COMERCIAIS BRASILEIROS PELA METODOLOGIA DE
MLSA (*MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS*)**

Londrina
2011

JAKELINE RENATA MARÇON DELAMUTA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESTIRPES DE
BRADYRHIZOBIUM UTILIZADAS EM INOCULANTES
COMERCIAIS BRASILEIROS PELA METODOLOGIA DE
MLSA (*MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dr^a Mariangela Hungria da Cunha

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D336t	<p>Delamuta, Jakeline Renata Marçon. Taxonomia e filogenia de estirpes de Bradyrhizobium utilizados em inoculantes comerciais brasileiros pela metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) / Jakeline Renata Marçon Delamuta. – Londrina, 2011. 52 f. : il.</p> <p>Orientador: Mariangela Hungria. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Microbiologia do solo – Teses. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 3. Rizóbio – Teses. 4. Genética bacteriana – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 631.461</p>
-------	--

JAKELINE RENATA MARÇON DELAMUTA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM*
UTILIZADAS EM INOCULANTES COMERCIAIS BRASILEIROS PELA
METODOLOGIA DE MLSA (*MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariangela Hungria da Cunha
Embrapa Soja/UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Pâmela Menna P. Pavanelli
Embrapa Soja/UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Embrapa Soja/UEL – Londrina – PR

Londrina, 27 de maio 2011.

*À minha mãe Marlene
Ao meu namorado Paulo Henrique*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Antes de dizer obrigada a todos que me ajudaram, devo agradecer primeiramente a Deus, pois encontrei Nele força para chegar aonde cheguei.

Agradeço à minha mãe Marlene, uma verdadeira guerreira que nunca mediu esforços para me educar. Agradeço pelo imenso apoio, carinho, amor, paciência e amizade. Meu amor e eterno agradecimento.

Ao meu namorado Paulo Henrique, meu grande incentivo. Obrigada por me ajudar a superar os momentos difíceis desta caminhada. Sem você não teria conseguido.

À minha orientadora, Dr^a Mariangela Hungria pela oportunidade. Mesmo sem me conhecer, ter aceitado me orientar; pela confiança e profissionalismo demonstrados. Você é um grande exemplo de vida para todos.

À Dr^a Pâmela Menna (Pam), minha grande amiga, por tudo o que me ensinou e por me “co-orientar”. Cheguei até aqui porque você sempre esteve ao meu lado, nos momentos de maior dificuldade e também nos de descontração. Eu te adoro.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira, pela amizade e pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

Ao meu amigo Renan Ribeiro, pela grande ajuda em todas as etapas dessa minha jornada e também pelos momentos “relax”. Aprendi muito com você.

À Ligia e à Eduara, técnicas do laboratório, pelo auxílio e conhecimento transmitidos.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa: Adriana (Pereira), Letícia, Renata, Marquito, Jesiane, Gesiele, Douglas, Soledad (sem esquecer o Caetano), Maria, Adalgisa, Juscélio, Rinaldo, Leopoldo, Rebeca, Dáfila, Vívian, Hosana, Josiane, Bettina, dona Rosa. Obrigada por todo incentivo e momentos alegres que passamos juntos.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Microbiologia da UEL, pelos sábios ensinamentos.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram no momento mais difícil que enfrentei.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja, pela estrutura fornecida para a realização da pesquisa.

Muito Obrigada!

DELAMUTA, Jakeline Renata Marçon. **Taxonomia e filogenia de estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais brasileiros pela metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*)**. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O gênero *Bradyrhizobium* compreende um diverso grupo de bactérias com capacidade de fazer simbiose com plantas da família Leguminosae. Estudos com *Bradyrhizobium* têm demonstrado uma elevada diversidade genética, principalmente com estirpes isoladas em regiões tropicais. A análise do gene ribossomal 16S (16S RNAr) tem sido a principal ferramenta utilizada em estudos de diversidade, taxonomia e também de filogenia bacteriana, mas devido ao alto nível de conservação da sequência nucleotídica deste gene, as informações obtidas podem limitar a determinação de novas espécies, como é o caso do gênero *Bradyrhizobium*. Desse modo, a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) tem sido recentemente proposta como uma ferramenta complementar em estudos de filogenia e taxonomia, bem como de diversidade em procariotos. Prévios estudos com as estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas neste trabalho demonstraram elevada diversidade genética do gene 16S RNAr com a hipótese de possíveis novas espécies. Utilizando a metodologia de MLSA, o objetivo do presente trabalho foi elucidar as relações filogenéticas de 12 estirpes de *Bradyrhizobium* e, assim, determinar sua posição taxonômica. Além do gene 16S RNAr, outros cinco genes *housekeeping* foram utilizados (*atpD*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*). A árvore filogenética resultante da análise do MLSA dividiu as estirpes em dois grandes grupos com subgrupos bem definidos, sugerindo a descrição de novas espécies. O primeiro grande grupo incluiu as estirpes tipo de *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. betae* e *B. canariense* e o segundo grande grupo incluiu a estirpe tipo de *B. elkanii* USDA 76^T. Uma grande diversidade foi observada na árvore filogenética do gene *atpD*, com a formação de um terceiro grande grupo formado por 4 estirpes e as estirpes tipo de *B. betae* LMG 21987^T e *B. liaoningense* LMG 18230^T. Os resultados obtidos demonstram uma elevada diversidade genética de *Bradyrhizobium* utilizados como inoculantes comerciais brasileiros, confirmando a existência de possíveis novas espécies. Portanto, a técnica de MLSA demonstrou ser um método rápido e eficaz em estudos filogenético e taxonômico de *Bradyrhizobium*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Rizóbios. Diversidade genética. Genes *housekeeping*. 16S RNAr.

DELAMUTA, Jakeline Renata Marçon. **Taxonomy and phylogeny of *Bradyrhizobium* strains used in Brazilian commercial inoculants by MLSA (Multilocus Sequence Analysis) method.** 2011. 52 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The genus *Bradyrhizobium* encompasses a variety of bacteria that can live in symbiosis with plants of the family Leguminosae. Studies with *Bradyrhizobium* strains have indicated a high genetic diversity, mainly with strains belonging tropical regions. The analysis of the 16S ribosomal gene (16S rRNA) has been the main tool in studies of phylogeny, taxonomy and also diversity of bacteria, but due to the high conservation of the nucleotide sequence, the information obtained may limit the determination of new species, such as occurs in the genus *Bradyrhizobium*. Thus, MLSA (Multilocus Sequence Analysis) method has been recently proposed as a strategy to determine the diversity in studies of taxonomy and phylogeny of prokaryotes. Previous studies using the 16S rRNA showed high diversity in the *Bradyrhizobium* strains of this work and the suggestion of the new species has been proposed. Using the MLSA method, the aim of this work was to elucidate the phylogenetic relationships and taxonomic positions of 12 *Bradyrhizobium* strains. In addition of the 16S rRNA gene, five housekeeping genes (*atpD*, *glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoB*) were used in the analysis. The phylogenetic tree resulting from analysis of MLSA divided the strains in two great groups with subgroups well defined, suggesting the description of new species. The first great group included the type strains of *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. betae* and *B. canariense*, and the second great group included the type strain of *B. elkanii* USDA 76^T. The greatest variability was observed in the phylogenetic tree of *atpD* gene, and a third group formed by four strains and *B. betae* LMG 21987^T and *B. liaoningense* LMG 18230^T was observed. The results obtained showed a high genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains used in commercial inoculants in Brazil and confirms the presence of new species. Thus, the MLSA method is a rapid and reliable tool to provide information about phylogenetic relationships and identify *Bradyrhizobium* strains potentially representative of novel species.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Rhizobia. Genetic diversity. Housekeeping genes. 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia de rizóbios (classe *Alphaproteobacteria*) com base na sequência do gene ribossomal 16S (Fonte: ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001)23

ARTIGO

Figure 1 – Phylogenetic relationships of *Bradyrhizobium* strains from this study and of reference/type rhizobial strains based on the 16S rRNA. Phylogeny was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA446

Figure 2 – Phylogenetic relationships of *Bradyrhizobium* strains from this study and of reference/type rhizobial strains based on the (a) *recA*, (b) *atpD*, (c) *glnII*, (d) *gyrB* and (e) *rpoB* genes. Method and parameters of analysis were as described for Figure 147

Figure 3 – Evolutionary tree inferred using the Neighbor-Joining method for 22 strains based on concatenated genes (*recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB*). The percentage of replicate trees in which the associated strains clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA448

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Information about the <i>Bradyrhizobium</i> strains from the Embrapa Soybean culture collection used in this study.....	49
Table 2 – Primers and DNA amplification conditions used in this study.....	50
Table 3 – GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of the <i>Bradyrhizobium</i> strains used in this study and of the reference/type strains	51
Table 4 – Sequence information obtained in this study.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	12
2.2	BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO	13
2.3	TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA	15
2.4	TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS E O GÊNERO BRADYRHIZOBIUM.....	19
3	OBJETIVO GERAL	24
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
5	ARTIGO	32
6	CONCLUSÕES	52

1 INTRODUÇÃO

Plantas da família Leguminosae, compreendendo aproximadamente 19.000 espécies, desempenham um importante papel ecológico, principalmente pelo fato de que 25% da produção mundial das principais culturas são derivadas dos legumes e mais de um terço das necessidades nutricionais de nitrogênio da humanidade é suprida pelas leguminosas (RIVAS et al., 2009). A ampla distribuição desses vegetais ocorre porque muitas espécies dentro desta família são capazes de estabelecer simbiose com um grupo de bactérias coletivamente chamadas de rizóbios, cuja característica mais importante é a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) (GERMANO et al., 2006).

Rizóbios possuem a capacidade de induzir a formação de estruturas altamente especializadas, chamadas nódulos, bem como de converter o N_2 em formas utilizáveis pelas plantas, um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001). Essas bactérias são muito diversas e atualmente estão classificadas em cinco gêneros dentro da classe *Alphaproteobacteria*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Além disso, existem outras bactérias pertencentes a gêneros distintos que foram descritas recentemente e que também são denominadas como rizóbios, uma vez que elas realizam simbiose com leguminosas (WILLEMS, 2006; HUNGRIA et al., 2007).

Como para outras bactérias, a taxonomia e o estudo da diversidade dos rizóbios têm sido influenciada pela classificação polifásica, levando em conta características fenotípicas, genéticas e filogenéticas (VANDAMME et al., 1996), sendo a análise do gene ribossomal 16S (RNAr) a principal ferramenta dos estudos filogenéticos (MARTENS et al., 2007).

Embora a filogenia bacteriana seja baseada no gene ribossomal 16S, uma vez que ele está presente em todos os organismos e evolui a uma taxa relativamente baixa (HARRIS et al., 2003), existem algumas desvantagens para seu uso exclusivo. Vários estudos têm demonstrado que os genes ribossomais podem sofrer transferência horizontal e recombinação genética (EARDLY et al., 2005; VAN BERKUM et al., 2003), bem como existir mais de uma cópia do gene 16S RNAr no genoma bacteriano (VAN BERKUM et al., 2003). Além disso, tem sido apontado que

espécies intimamente relacionadas não podem ser distinguidas em relação ao gene 16S RNAr devido ao seu alto nível de conservação (MARTENS et al., 2007).

Para contornar essa limitação, genes que são essenciais para manutenção do metabolismo basal (*housekeeping*) bem como aqueles que codificam proteínas estão sendo utilizados por fornecer melhores informações sobre a taxonomia e a filogenia das espécies, notoriamente dos rizóbios (TURNER; YOUNG, 2000; GAUNT et al., 2001; STEPKOWSKI et al., 2003; ALEXANDRE et al., 2008; ROMA NETO et al., 2010). Estes genes possuem um nível maior de sequências divergentes do que o gene 16S RNAr, porém suficientemente conservadas para manter as relações filogenéticas (STACKEBRANDT et al., 2002).

Como citado anteriormente, a filogenia baseada apenas em um único gene pode ser controversa visto que esses genes podem ser transferidos horizontalmente (GEVERS et al., 2005). Para melhorar a compreensão das relações taxonômicas entre os procariotos, foi desenvolvida a metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA). O MLSA consiste na análise conjunta de múltiplos genes *housekeeping* que estão presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família) e em única cópia, e representa uma estratégia útil uma vez que funciona como um tampão contra os efeitos da recombinação gênica e da transferência horizontal (GEVERS et al., 2005). Nesse contexto, esta metodologia está se mostrando cada vez mais útil nos estudos filogenéticos e uma prova disto é a sua utilização, nos últimos anos, em vários gêneros procarióticos.

A biodiversidade microbiana nos trópicos é elevada, porém ainda é pouco caracterizada. O crescente número de técnicas eficazes para a caracterização bacteriana tem permitido um grande progresso na taxonomia desses microorganismos, principalmente em relação aos rizóbios, possibilitando a identificação de possíveis novas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) está presente em diversas formas na biosfera. O N, por ser um constituinte de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, moléculas fundamentais para todos os processos biológicos, é o quarto nutriente mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono (C), pelo oxigênio (O) e pelo hidrogênio (H) (MORGANTE, 2003). A atmosfera contém uma vasta quantidade (cerca de 78% por volume) de nitrogênio molecular (N_2) (TAIZ; ZEIGER, 2004), porém, apesar da sua abundância, este elemento não está diretamente disponível para os eucariotos, pois estes são incapazes de absorver o N_2 e convertê-lo a uma forma assimilável, devido à tripla ligação que existe entre os átomos do N_2 , que é uma das mais fortes que se tem conhecimento na natureza (HUNGRIA et al., 2001).

O N existe na natureza como nitrogênio molecular (N_2) ou em várias outras formas como íons de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), amônia (NH_3), amônio (NH_4^+) e também incorporado em compostos orgânicos nitrogenados (DROZDOWICZ, 1997; CÓN SUL et al., 2004). A maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de NO_3^- , havendo algumas que o absorvem sob a forma de íon amônio (NH_4^+) (MORGANTE, 2003).

As principais fontes de nitrogênio assimilável para as plantas são: 1- o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2-a fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; 3-os fertilizantes nitrogenados, derivados de processo industrial; e 4-o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). O N presente na matéria orgânica do solo é limitado, podendo ser esgotado rapidamente após alguns cultivos. Os fertilizantes nitrogenados, entretanto, representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, mas a um custo de produção econômica e ambientalmente elevados (HUNGRIA et al., 2007). O processo industrial que transforma o N_2 em NH_3 requer hidrogênio (derivado do gás de petróleo), catalisador contendo ferro, altas temperaturas (300 a 600°C) e altas pressões (200 a 800 atm). Desse modo, o gasto de fontes energéticas não renováveis é estimado em seis barris de petróleo por

tonelada de NH_3 sintetizada. Um agravante na utilização dos fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas nos sistemas de produção, raramente ultrapassando 50%. Deve-se considerar, ainda, que o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados resulta em poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos a peixes e ao homem (HUNGRIA et al., 2007). Outro processo biológico que pode ocorrer é a desnitrificação do nitrato por bactérias específicas do solo, que resulta na liberação de N_2O , um dos gases responsáveis pelo efeito estufa (VIEIRA, 2004; CARMO et al., 2005).

A fixação biológica do N_2 é um processo realizado por diversas espécies de bactérias que habitam o solo, denominadas organismos fixadores de nitrogênio ou diazotróficos, e representa a forma mais importante de fixar o N_2 atmosférico em amônia. As bactérias que fixam 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 MoFe-proteína, acumulando 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 o processo de fixação biológica contribua com 65% de todas as entradas de N na Terra, enquanto que a produção industrial contribui com 25% e a fixação não-biológica com cerca de 10% (HUNGRIA et al., 2001).

2.2 BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO

A maior parte dos organismos procariotos fixadores de nitrogênio tem vida livre no solo. Algumas bactérias fixadoras de nitrogênio se associam a diversas plantas em diferentes graus de especificidade, levando à sua classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (HUNGRIA et al., 2007). Poucas formam associações simbióticas com plantas superiores, nos quais o procarionte fornece diretamente à planta hospedeira o nitrogênio fixado, em troca de

outros nutrientes, como ácidos orgânicos e aminoácidos, e carboidratos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A forma mais comum de associação simbiótica ocorre entre as espécies da família Leguminosae e bactérias da classe *Alphaproteobacteria* pertencentes aos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, e outros gêneros descritos recentemente, incluindo *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus*, sendo os dois últimos gêneros pertencentes à classe *Betaproteobacteria* (HUNGRIA et al., 2007; WILLEMS, 2006). Estes microorganismos induzem à formação de órgãos especializados, chamados nódulos, que são estruturas especializadas onde ocorre o processo de fixação de nitrogênio. Esses simbioses têm grande importância ambiental e agrícola, uma vez que são responsáveis pela maior parte da fixação de nitrogênio atmosférico na terra (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001).

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios não é obrigatória. Entretanto, sob condições limitadas de nitrogênio, os simbioses procuram uns aos outros, por meio de uma elaborada troca de sinais moleculares (TAIZ; ZEIGER, 2004), resultando na formação de um novo órgão na raiz da planta, o nódulo. 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 carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor necessário para o processo de fixação biológica. As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1994).

O processo da nodulação radicular inicia-se com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos que agem como substâncias quimiotáticas e estimulam a multiplicação das bactérias na rizosfera (HUNGRIA, 1994). Geralmente, estes compostos excretados são açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos, que além da atração, promovem a adesão dos rizóbios aos pelos radiculares das plantas, um processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: na primeira etapa, as bactérias aderem à superfície radicular e, em seguida, outras bactérias se aderem às que estão presas aos pelos radiculares. Simultaneamente a essa adesão, ocorre uma troca de sinais moleculares entre o microsimbionte e a planta hospedeira, que libera compostos fenólicos, flavonóides

e também betaínas, os quais induzem a transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias (HUNGRIA et al., 1997). Na segunda etapa da sinalização molecular, os rizóbios sintetizam os fatores de nodulação, ou fatores Nod, que são oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) responsáveis pelas modificações radiculares no pré-estágio de infecção, como: formação de raízes curtas e grossas, deformação, encurvamento e aumento no número de pelos radiculares, seguidos por invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pelo radicular, que cresce da extremidade do pelo radicular encurvado em direção ao córtex, conduzindo o rizóbio para as células interiores (HUNGRIA et al., 1994). Simultaneamente à infecção ocorrem os processos de divisão das células do córtex e formação do primórdio do nódulo. Os cordões de infecção entram nas células desse primórdio, em cujo citoplasma as bactérias são liberadas envoltas em uma membrana. Em seguida, os primórdios diferenciam-se em nódulos – autênticos órgãos de especialização celular -dentro dos quais as bactérias se diferenciam em bacteróides, formas capazes de fixar N_2 . Nos bacteróides ocorre a síntese das enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do N_2 e com a assimilação do nitrogênio fixado, dando início ao processo de FBN (HUNGRIA et al., 1994).

2.3 TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA

O termo taxonomia é, geralmente, considerado como sinônimo de sistemática ou biosistemática e é dividido em três partes: classificação, nomenclatura e identificação. Atualmente, a taxonomia microbiana integra diferentes tipos de dados e informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas, sendo denominada de taxonomia polifásica. A informação genotípica é derivada de ácidos nucléicos (DNA e RNA) presentes nas células, enquanto que a informação fenotípica é derivada de proteínas e suas funções, diferentes marcadores quimiotaxonômicos, e uma vasta gama de outras características expressas (VANDAMME et al., 1996).

Uma espécie bacteriana é hoje definida como um grupo de estirpes/isolados genomicamente semelhante, que compartilham um elevado grau de similaridade em várias características independentes (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Considera-se também como espécie procariótica um grupo de estirpes, incluindo a estirpe padrão, que compartilham 70% ou mais de similaridade por hibridação DNADNA (HDD) e mais de 97% de similaridade na sequência do

gene ribossomal 16S (VANDAMME et al., 1996). Desde a década de 1970, uma espécie bacteriana tem sido delineada com base nos dados obtidos em experimentos de hibridação DNA-DNA, onde estirpes que compartilham menos de 50% de HDD definitivamente pertencem a espécies diferentes (GEVERS et al., 2005).

A filogenia, definida como o estudo das relações taxonômicas, é amplamente utilizada para determinar a relação existente entre os organismos, indicando seu possível grupo, suas relações com outros grupos e seu lugar nas famílias e reinos. A filogenia pode, também, ajudar a reconhecer ancestrais. Em bactérias a filogenia é baseada, principalmente, em dados de sequenciamento de macromoléculas biológicas. Moléculas mais conservadas ajudam a comparar organismos relacionados distantemente, enquanto que moléculas que mudam rapidamente permitem identificar mudanças pequenas e recentes (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000).

Zuckerlandl e Pauling (1965) propuseram utilizar moléculas biológicas como documentos históricos evolutivos, fornecendo a base para uma filogenia molecular. Com o desenvolvimento de metodologias de sequenciamento molecular, essas idéias iniciais se tornaram aplicáveis. Woese e Fox (1977) demonstraram que, para determinar as relações que abrangem todo o espectro de sistema vivo existente, é necessário a utilização de uma molécula de ampla distribuição entre os seres vivos. Eles propuseram a utilização do RNA ribossomal (RNAr), mais especificamente da subunidade menor do ribossomo (16S para procariotos e 18S para eucariotos) como marcador filogenético universal, uma vez que a sequência do RNAr está presente em todos os organismos, evoluem em uma taxa relativamente baixa, permitindo a detecção de parentesco entre as espécies muito distantes, e sofrem pouca ou nenhuma transferência horizontal (HARRIS et al., 2003).

Os estudos do grupo de Woese permitiram a construção de uma árvore filogenética universal com base nos genes ribossomais. Nessa árvore, os organismos são agrupados nos domínios Bacteria, Archaea e Eucaria (WOESE et al., 1990). A partir dos estudos realizados por Woese, o gene ribossomal 16S passou a ser amplamente utilizado para fazer construções filogenéticas, uma vez que sua sequência nucleotídica apresenta uma estrutura mosaica, onde existem regiões muito conservadas e outras variáveis, úteis para estabelecer relações

filogenéticas (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005). Devido às mudanças que ocorrem em suas sequências de DNA ao longo da evolução, pode ser feita uma estimativa do tempo de divergência entre as linhagens (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Em relação ao gene ribossomal 16S, o consenso atual é de que espécies que apresentam uma similaridade na sequência do gene ribossomal inferior a 97% em relação à estirpe-tipo não pertencem àquela espécie, o que permite aos microbiologistas identificarem rapidamente novas espécies procarióticas (GEVERS et al., 2005). Em alguns casos, os resultados obtidos pela análise do gene 16S RNAr nem sempre estão de acordo com aqueles observados por HDD. Considera-se que isolados que compartilham menos de 97% de similaridade no gene 16S RNAr apresentam um valor de HDD abaixo de 70%, e dessa forma pertencem a uma espécie diferente; porém foi observado que isolados que possuem uma semelhança maior que 97% em relação ao gene ribossomal da estirpe-tipo podem não compartilhar o valor de 70% na HDD, o que é crítico para incluir um isolado em uma determinada espécie (GEVERS et al., 2005).

Embora as vantagens da utilização de técnicas de genotipagem direta sejam claras, a classificação das bactérias utilizando apenas a sequência do gene RNAr, uma prática cada vez mais comum nos laboratórios, é insatisfatória por vários motivos. Vários estudos têm demonstrado que os genes ribossomais podem sofrer transferência horizontal e recombinação genética, resultando em sequências mosaicos (VAN BERKUM et al., 2003; EARDLY et al., 2005), bem como abrigar mais de uma cópia do gene 16S RNAr (VAN BERKUM et al., 2003). Outra desvantagem do gene 16S RNAr no estudo filogenético é que espécies muito relacionadas nem sempre podem ser distinguidas devido ao alto nível de sequências nucleotídicas conservadas desse gene. Essas observações implicam em que a análise filogenética bacteriana, com base exclusivamente no gene ribossomal 16S, pode nem sempre refletir corretamente a filogenia dos procariotos (MARTENS et al., 2007). Juntamente com a análise do gene 16S RNAr, a técnica de HDD é necessária para determinar espécies bacterianas. Todavia, tem sido demonstrado que essa metodologia tem várias limitações por ser um procedimento difícil, trabalhoso e demorado, realizado em poucos laboratórios e não pode ser utilizado para uma rápida identificação dos procariotos, além de ser inadequado para estimar

as distâncias genéticas entre espécies que são distantemente relacionadas (GEVERS et al, 2005; MARTENS et al., 2008).

Atualmente tem sido proposta a utilização de marcadores filogenéticos alternativos. Esses marcadores são genes (no mínimo cinco) que codificam proteínas, com um nível maior de sequências divergentes do que o gene 16S RNAr, todavia suficientemente conservados para manter as relações filogenéticas (STACKEBRANDT et al., 2002). Estes devem ser genes cromossomais de cópia única distribuídos universalmente entre os procariotos (MARTENS et al., 2007), sendo que a análise conjunta de múltiplos genes fornece um tampão contra os efeitos da recombinação gênica e da transferência horizontal que podem ocorrer quando um único gene é analisado (GEVERS et al., 2005). De acordo com Zeigler (2003), os genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios, como: *i*) estarem distribuídos no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; *ii*) estarem presentes no genoma em uma única cópia; *iii*) terem extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento; *iv*) contenham informações suficientes para as análises; e finalmente, *v*) 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 hibridação DNA-DNA.

Com base nessa proposta, foi desenvolvida a metodologia de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), utilizada para a caracterização genotípica de procariotos em nível infra-específico. Atualmente, o MLST é muito utilizado na epidemiologia molecular para diferenciação de linhagens de uma mesma espécie (GEVERS et al., 2005) e consiste no sequenciamento e análise (similaridade alélica) conjunta (como uma única sequência concatenada) de, no mínimo, cinco (usualmente sete) genes *housekeeping* (STACKEBRANDT et al., 2002).

A fim de ser utilizada na taxonomia bacteriana com o objetivo de elucidar as relações taxonômicas entre espécies, além de ajudar na definição de espécies, foi desenvolvida a metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), baseada na técnica de MLST (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007). O MLSA utiliza genes que estão presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família), e em única cópia. As informações obtidas pela combinação de múltiplos genes podem fornecer uma visão global e confiável das relações existentes entre os micro-organismos (MARTENS et al., 2008). Devido

ao seu alto poder de resolução, a metodologia de MLSA tem permitido a discriminação em nível de espécie onde, inicialmente, os organismos são identificados em nível de gênero ou família com base no gene ribossomal 16S e, posteriormente, identificados em nível de espécie com base na metodologia de MLSA (GEVERS et al., 2005). Zeigler (2003) afirmou que um pequeno número de genes selecionados cuidadosamente e que preenchem os requisitos dos marcadores alternativos podem igualar ou até mesmo serem superiores à precisão da hibridação DNA-DNA. De fato, estes resultados foram confirmados por Martens et al. (2008) ao comparar os resultados obtidos por MLSA e HDD para espécies do gênero *Ensifer*.

A metodologia de MLSA foi utilizada com sucesso em vários gêneros procarióticos, incluindo *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Ensifer*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (PRIEST et al., 2004; DEVULDER et al., 2005; THOMPSON et al., 2005; MARTENS et al., 2007; 2008; MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009), com os três últimos compreendendo espécies que fixam nitrogênio e fazem simbiose com leguminosas.

Entre os vários genes com funções conservadas que estão sendo utilizados recentemente para melhorar a filogenia revelada pela análise do gene ribossomal 16S de espécies de rizóbios estão: *glnII*, *glnA*, *gltA*, *recA*, *atpD*, *dnaK*, *rpoB*, *thrC*, *gyrB*, *gap*, *pnp*, *rpoB*, *dnaJ*, *rpoA* (TURNER; YOUNG, 2000; GAUNT et al., 2001; STEPKOWSKI et al, 2003; HERNÁNDEZ-LUCA et al., 2004; MARTENS et al., 2007, 2008; ALEXANDRE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009). As filogenias construídas com um único gene nem sempre estão de acordo com aquelas reveladas pela filogenia do gene 16S RNAr, uma vez que genes isolados refletem parcialmente as similaridades do genoma e também podem sofrer transferência horizontal e recombinação gênica (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; RIVAS et al., 2009).

2.4 TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS E O GÊNERO *BRADYRHIZOBIUM*

Os rizóbios são diversos, e, durante os últimos anos, sua classificação sofreu grandes mudanças devido aos novos dados filogenéticos e polifásicos, levando à descrição de novas taxa (YOUNG; HAUKKA, 1996). Este ainda é um campo em extensão, devido ao isolamento de mais rizóbios e sua

caracterização, especialmente nos trópicos e regiões mediterrâneas onde a diversidade dessas bactérias é pouco documentada (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001).

Bactérias diazotróficas, responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio, foram primeiramente isoladas em 1888 por Beijerinck, que as denominou de *Bacillus radicola*. Posteriormente, esse nome foi substituído por *Rhizobium*, com apenas uma única espécie descrita, *R. leguminosarum* (FRANK, 1889). No início do século XX os rizóbios foram classificados taxonomicamente com base no conceito de grupo de inoculação cruzada, onde o micro-organismo era classificado de acordo com a leguminosa a qual nodulava (FRED et al., 1932). Até o início de 1980, todas as bactérias fixadoras de nitrogênio, simbióticas de leguminosas, estavam classificadas em um único gênero, *Rhizobium*, incluindo seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*.

A taxonomia baseada no conceito de inoculação cruzada falhou devido às observações de que uma única leguminosa poderia abrigar diferentes bactérias simbióticas. No início da década de 1960, os bacteriologistas passaram a utilizar uma grande variedade de características morfológicas, nutricionais, metabólicas, sorológicas e genéticas em estudos de taxonomia numérica (WILLEMS, 2006), e como consequência, o gênero *Bradyrhizobium* foi descrito (JORDAN, 1982), incluindo como espécie-tipo *B. japonicum*. *Bradyrhizobium* (*bradus* (grego) = lento) se diferencia de *Rhizobium* pelo crescimento mais lento e alcalinização do meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono.

Na década de 80, vários trabalhos começaram a demonstrar a existência de grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum*, possibilitando a sua divisão em dois grupos com características diferentes. Esses estudos levaram Kuykendall et al. (1992) a sugerirem a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I, e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II. *Bradyrhizobium* também se diferencia de *Rhizobium* devido à ausência do plasmídeo simbiótico, contendo genes de nodulação e fixação de N₂ (genes *nod* e *nif*), característico de *Rhizobium*. Em *Bradyrhizobium*, os genes simbióticos localizam-se no cromossomo (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005). Baseado nas sequências do DNA ribossomal 16S, os simbiontes de leguminosas foram classificados em seis gêneros, *Azorhizobium*,

Bradyrhizobium, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, compreendidos na classe *Alphaproteobacteria* (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001).

Atualmente, apesar da enorme quantidade de isolados disponível, o gênero *Bradyrhizobium* possui apenas nove espécies descritas, sete delas capazes de induzir nódulos em várias leguminosas: *B. japonicum* (JORDAN, 1982), *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992) e *B. liaoningense* (XU et al., 1995) estabelecem simbiose com a soja (*Glycine max*); *B. yuanmingense* (YAO et al., 2002), que nodula *Lespedeza cuneata*; *B. canariense* (VINUESA et al., 2005), que nodula arbustos das tribos *Genisteae* e *Loteae*; *B. pachyrhizi* e *B. jicamae* (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2009), nodulam *Pachyrhizus erosus*; *B. iriomotense* (ISLAM et al., 2008), isolado do tumor de *Entada koshunensis* no Japão e *B. betae* (RIVAS et al., 2004), isolado do tumor de *Beta vulgaris* L. O principal fator que limita a avaliação taxonômica e as inter-relações entre espécies deste gênero é a elevada similaridade nas sequências do gene 16S RNAr, onde muitas estirpes apresentam uma divergência de 0,1-2,0% para o gene em questão (WILLENS, 2006). Com base no gene 16S RNAr, espécies de *Bradyrhizobium* são agrupadas com *Afipia* sp., *Blastobacter denitrificans* e *Rhodopseudomonas*. Nesse caso, o parentesco filogenético entre *Bradyrhizobium japonicum*, *Afipia* sp., *Bl. denitrificans* e *Rhodopseudomonas palustris* é maior do que entre *B. japonicum* e *B. elkanii* (DUPUY et al., 1994).

O gênero *Azorhizobium* atualmente contém apenas duas espécies: *A. caulinodans* (DREYFUS et al., 1988) e *A. doebereineriae* (MOREIRA et al., 2006). *A. caulinodans* é capaz de nodular caule e raiz de *Sesbania rostrata* crescida na África. Esta espécie pode ser diferenciada pela sua habilidade de formar nódulos em caules e fixar nitrogênio *in vitro* (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001). *A. doebereineriae* nodula a raiz de *Sesbania virgata* no Brasil.

Bactérias do gênero *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997) nodulam uma diversidade de leguminosas e são caracterizadas pelo seu crescimento lento ou moderadamente lento e reação ácida a neutra em meio contendo manitol como fonte de carbono, características de todas as 21 espécies descritas nesse gênero: *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. septentrionale*, *M. temperatum*, *M. thiogangeticum*, *M. albiziae*, *M. alhagi*, *M. australicum*, *M. caraganae*, *M. gobiense*, *M. metallidurans*, *M. opportunistum*, *M. robiniae*, *M. shangrilense* e *M. tarimense* (RIVAS et al., 2009). Estas espécies formam um grupo na árvore filogenética com base no gene 16S

RNAr com maior parentesco com as espécies de *Rhizobium* do que com espécies dos gêneros *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Os gêneros *Allorhizobium* (de LAJUDIE et al., 1998b), *Rhizobium* (FRED et al., 1932), e *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1988; de LAJUDIE et al., 1994) estão agrupados próximos na árvore filogenética com base no 16S RNAr. O gênero *Sinorhizobium* forma um grupo bem definido na árvore filogenética, com um alto nível de sequências semelhantes entre as 11 espécies descritas para esse gênero (RIVAS et al., 2009). Os gêneros *Sinorhizobium* e *Rhizobium* estão mais relacionados entre si e menos próximos ao gênero *Mesorhizobium*. Análises filogenéticas dos genes 16S RNAr e *recA* indicam que o gênero *Ensifer* forma um grupo bem relacionado com *Sinorhizobium*, o que levou Willems et al. (2003) a concluir que estes dois gêneros representam um único táxon e, portanto, deveriam ser unidos em um único gênero, *Ensifer*. Porém, a transferência dos membros do gênero *Sinorhizobium* para o gênero *Ensifer* não foi aceita pelo Subcomitê de Taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, pois pode causar confusão na comunidade científica (LINDSTRÖM; YOUNG, 2009). Com base nas análises comparativas do gene 16S DNAr, espécies dentro do gênero *Allorhizobium* e *Rhizobium* são relacionadas às bactérias patogênicas de plantas pertencentes ao gênero *Agrobacterium*. *A. rhizogenes* é intimamente relacionada à *R. tropici* e formam um grupo com *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. mongolense* e *R. hainanense* (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000). Como consequência, Young et al. (2001) propuseram agrupar os três gêneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium* e *Rhizobium* em um único gênero, *Rhizobium*, que possui, atualmente, 35 espécies descritas (RIVAS et al., 2009).

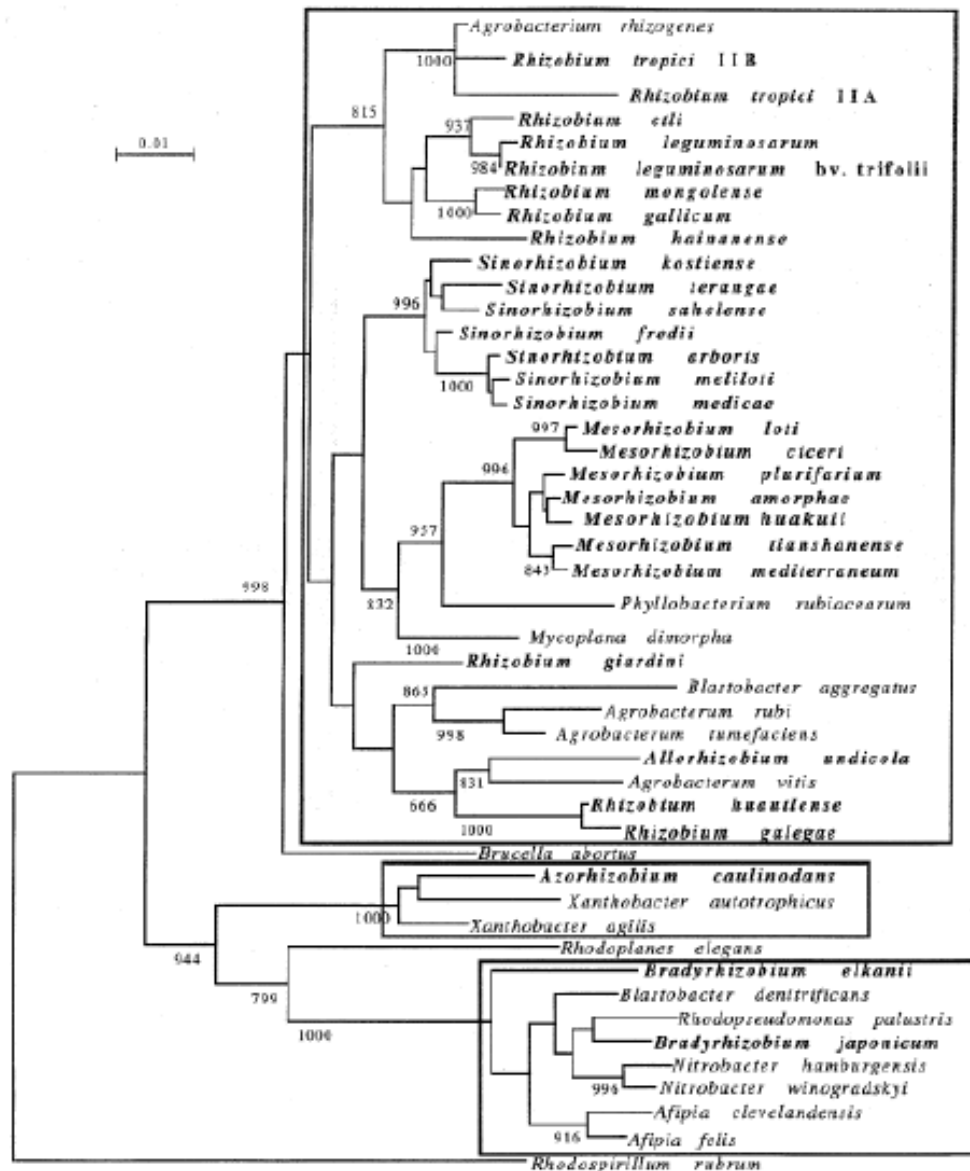
A Figura 1 apresenta a filogenia dos rizóbios com base no gene ribossomal 16S e de outras bactérias da classe *Alphaproteobacteria*.

Como conclusão, tem-se que os estudos taxonômicos de rizóbios estão em constante progresso, uma vez que mais leguminosas são estudadas e um número maior de técnicas eficazes está disponível para caracterização bacteriana. Estima-se que apenas 23% do total de leguminosas foram caracterizadas com relação aos seus microssimbiontes até agora (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001), e somente uma fração das espécies bacterianas já foi identificada (HAWKSWORTH, 1991). Estudos sobre a diversidade bacteriana fornecem informações sobre o processo de vida e evolução e, pelo uso de informações das sequências de DNA ou

RNAr, relações evolucionárias entre diferentes organismos podem ser estabelecidas (KENNEDY, 1999).

A biodiversidade de rizóbios nos trópicos é alta, mas ainda pouco estudada e, embora a fixação biológica de N_2 seja um processo chave para a sustentabilidade dos (agro) ecossistemas, a diversidade genética das bactérias diazotróficas simbióticas tem sido pouco investigada (ROMA NETO et al., 2010). Além disso, o conhecimento da diversidade bacteriana aumenta o entendimento de interações biológicas e auxilia na conservação e restauração biológica (KENNEDY, 1999).

Figura 1 – Filogenia de rizóbios (classe *Alphaproteobacteria*) com base na sequência do gene ribossomal 16S (Fonte: ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001).



3 OBJETIVO GERAL

Utilizar a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) para refinar a posição taxonômica e filogenética de 12 estirpes de *Bradyrhizobium* que apresentam elevada diversidade genética do gene 16S RNAr em relação às outras espécies desse gênero.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir árvores filogenéticas individuais para cada um dos genes *housekeeping* (*atpD*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*) utilizados no presente estudo e compará-las à árvore construída com as sequências do gene ribossomal 16S.

- Construir uma árvore filogenética a partir das sequências dos genes *housekeeping* agrupados a fim de verificar as relações filogenéticas entre as estirpes de *Bradyrhizobium* bem como identificar possíveis novas espécies.

- Submeter as sequências obtidas ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, A.; LARANJO, M.; YOUNG, J. P. W.; OLIVEIRA, S. *dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2839-2849, 2008.
- BEIJERINCK, M. W. Cultur des *Bacillus radicolica* aus den Knöllchen. **Botanische Zeitung**, v.46, p.740-750, 1888.
- CARMO, J. B.; ANDRADE, C. A. de; CERRI, C. C.; PICCOLO, M. C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.735-746, 2005.
- CHEN, W. X.; WANG, E. T.; WANG, S. Y.; LY, Y. B.; CHEN, X. Q.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xingjian, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.153159, 1995.
- CHEN, W. X.; LY, G. S.; QI, Y. L.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J. L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280, 1991.
- CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988.
- CÓNSUL, J. M. D.; THIELE, D.; VESES, R. C.; BAIBICH, I. M.; DALLAGO, R. M. Decomposição catalítica de óxidos de nitrogênio. **Química Nova**, v.27, p. 432-440, 2004.
- de LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.369-382, 1998a.
- de LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B. L.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.1277-1290, 1998b.
- de LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994.

- DEVULDER, G.; PEROUSE DE MONTCLOS, M.; FLANDROIS, J. P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.293-302, 2005.
- 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**, v.38, p.89-98, 1988.
- DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1997. p.17-65.
- DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; WANDENBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREFUS, B.; KERSTERS, K.; COLLINS M. D.; GILLIS M. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.461-473, 1994.
- EARDLY, B. D.; NOUR, S. M.; VAN BERKUM, P.; SELANDER, R. K. Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1328-1335, 2005.
- FRANK, A. B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p.332-346, 1889.
- FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2037-2048, 2001.
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.217-229, 2006.
- 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**, v.3, p.733-739, 2005.
- HARRIS, J. K.; KELLEY, S. T.; SPIEGELMAN, G. B.; PACE, N. R. The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, v.13, p.407-412, 2003.
- HAWKSWORTH, D. L. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture**. CAB International, Redwood Press, Melksham, UK, 1991, 302p.

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**, v.27, p.703-706, 2004.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro, Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

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

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: Embrapa Cerrados, 1997. p.189-294.

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. (Eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p.9-89.

HUNGRIA, M., Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, n.3, p.339-364, 1994.

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.72, n.6, p.1416-1429, 2008.

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 mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesohizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.

JARVIS, B. D. W.; PANKHURST, C. E.; PATEI, J. J. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.378-380, 1982.

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

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.65-76, 1999.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.

LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J. P. W. International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.59, p.921-922, 2009.

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

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.200-214, 2008.

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

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.2934-2950, 2009.

MOREIRA, F. M. de S.; CRUZ, L.; FARIA, M. de.; MARSH, T.; MARTÍNEZROMERO, E.; PEDROSA, R. M. P.; YOUNG, P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.197-206, 2006.

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**, disponível em <<http://www.quimica10.com.br>> acesso em 28 set 2009.

NOUR, S. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M. P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.640-648, 1995.

NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL J. C. *Rhizobium ciceri* sp. nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.511-522, 1994.

PRIEST, F. G.; BARKER, M.; BAILLIE, L. W. J.; HOLMES, E. C.; MAIDEN, M. C. J. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.7959-7970, 2004.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, P.; CAMACHO, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; WILLEMS, A.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1929-1934, 2009.

- RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.
- RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v.2, p.51-69, 2009.
- RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J. L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1271-1275, 2004.
- ROMA NETO, I. V.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1291-1302, 2010.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.
- STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043-1047, 2002.
- STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, M.; 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**, v.26, p.483-494, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.286-298.
- 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**, v.71, p.5107-5115, 2005.
- TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. W. The Glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, p.309-319, 2000.
- VAN BERKUM, P.; TEREFWORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTRÖM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.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**, v.60, p.407-438, 1996.

VIEIRA, R. F. **Adubação molíbdica no feijoeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 2p. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 10).

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.569-575, 2005.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E. W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. p.177-186.

WANG, E. T.; VAN BERKUM, P.; SUI, X. H.; BEYENE, D.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.51-65, 1999.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p.3-14, 2006.

WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; MUÑOZ-ADELANTADO, E.; GORIS, J.; DE VOS, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1207-1217, 2003.

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 of United States of America**, v.87, p.4576-4579, 1990.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.74, n.11, p.5088-5090, 1977.

XU, L. M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.706-711, 1995.

YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2219-2230, 2002.

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**, v.51, p.89-103, 2001.

YOUNG, J. P. W.; HAUKKA, K. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytology**, v.133, p.87-94, 1996.

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

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

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. **Journal of Theoretical Biology**, v.8, p.357-366, 1965.

4 ARTIGO

Brazilian Journal of Microbiology

Genetics and Molecular Microbiology

MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA) OF *BRADYRHIZOBIUM* STRAINS: REVEALING HIGH DIVERSITY OF TROPICAL DIAZOTROPHIC SYMBIOTIC BACTERIA

**Jakeline Renata Marçon Delamuta^{1, 2, 3}, Renan Augusto Ribeiro^{1,2,5}, Pâmela
Menna^{1,3}, Eliane Villamil Bangel⁴, Mariangela Hungria^{1,2,3,*}**

E-mails:

jake_renata@hotmail.com

renanribeiro83@hotmail.com

pamela_menna@yahoo.com.br

eliane-bangel@fepagro.rs.gov.br

Author for correspondence Mariangela Hungria Embrapa Soja Cx. Postal 231 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil telephone: (+55)4333716206 fax: (+55)4333716100

E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br; hungria@pq.cnpq.br

¹ Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil;

² Universidade Estadual de Londrina, Dept. Microbiologia, Londrina, PR, Brazil;

³ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil;

⁴ FEPAGRO, Porto Alegre, RS, Brazil;

⁵ Fundação Araucária, Curitiba, PR, Brazil.

**MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA) OF *BRADYRHIZOBIUM* STRAINS:
REVEALING HIGH DIVERSITY OF TROPICAL DIAZOTROPHIC SYMBIOTIC
BACTERIA**

**Jakeline Renata Marçon Delamuta^{1,2,3}, Renan Augusto Ribeiro^{1,2,5}, Pâmela
Menna^{1,3}, Eliane Villamil Bangel⁴, Mariangela Hungria^{1,2,3,*}**

ABSTRACT: Symbiotic association of several genera of bacteria collectively called as rhizobia and plants belonging to the family Leguminosae (=Fabaceae) results in the process of biological nitrogen fixation, playing a key role in global N cycling, and also bringing relevant contributions to the agriculture. *Bradyrhizobium* is considered as the ancestral of all nitrogen-fixing rhizobial species, probably originated in the tropics. The genus encompasses a variety of diverse bacteria, but the diversity captured in the analysis of the 16S rRNA is often low. In this study, we analyzed twelve *Bradyrhizobium* strains selected from previous studies performed by our group for showing high genetic diversity in relation to the described species. In addition to the 16S rRNA, five housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB* and *rpoB*) were analyzed in the MLSA (multilocus sequence analysis) approach. Analysis of each gene and of the concatenated housekeeping genes captured a considerably higher level of genetic diversity, with indication of putative new species. The results highlight the high genetic variability associated with *Bradyrhizobium* microsymbionts of a variety of legumes. In addition, the MLSA approach has proved to represent a rapid and reliable method to be employed in phylogenetic and taxonomic studies, speeding the identification of the still poorly known diversity of nitrogen-fixing rhizobia in the tropics.

Keywords: Biological nitrogen fixation. *Bradyrhizobium*. Multilocus sequence analysis. Phylogeny. Taxonomy

¹ Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil;

² Universidade Estadual de Londrina, Dept. Microbiologia, Londrina, PR, Brazil;

³ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil;

⁴ FEPAGRO, Porto Alegre, RS, Brazil;

⁵ Fundação Araucária, Curitiba, PR, Brazil.

* Corresponding author

Introduction

Species of the large family Leguminosae (Fabaceae in the USA) occupy a broad-range of terrestrial biomes, with several of them being capable of establishing symbioses with bacteria collectively called rhizobia, starting the process of fixing atmospheric nitrogen (N_2). Diazotrophic bacteria were first isolated from root nodules and characterized in 1888 by Martinus Willem Beijerinck (2) as *Bacillus radicicola*, but then reclassified into the genus *Rhizobium*, with the taxonomy based on nodulation with certain host plants, establishing the “cross-inoculation group” concept (11). Taxonomical classification remained unaltered until the early 1980s, when numerical taxonomy considering morphological, physiological and genetic patterns led to the positioning of some strains into a new genus, *Bradyrhizobium*, with a unique defined species, *B. japonicum* (17). *Bradyrhizobium* includes slow growers that produce alkaline reaction in culture medium with mannitol as carbon source, while *Rhizobium* contains fast growing acid producers (17, 18).

A few years later, high diversity among *Bradyrhizobium* strains led to the description of a new species named *Bradyrhizobium elkanii* (21); however, the development of several molecular techniques helped to identify high genetic diversity among *Bradyrhizobium* strains isolated from a wide range of leguminous plants (e.g., 13, 26, 27, 43). Nowadays, there are nine defined *Bradyrhizobium* species (7), but certainly many more should be described in the next years.

Sequencing of the 16S rRNA has become the method of choice for tracing bacterial phylogenies (12, 47, 49), but in several genera including *Bradyrhizobium* variability in the 16S rRNA is often low and may not reflect the diversity detected by other morphophysiological and genetic properties (e.g., 13, 26, 40, 43, 48). To detect higher diversity, additional genes to the 16S rRNA may be analyzed, and initially ribosomal genes as the 23S rRNA and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) were chosen, for showing long fragments with a faster rate of sequence change, thus adding valuable information to the analysis of the 16S rRNA (e.g., 27, 39, 40, 43, 48). However, proximity of ribosomal genes might not properly indicate the correct phylogeny in the case of horizontal gene transfer (41).

The multilocus sequence analysis (MLSA) method has been increasingly used in phylogeny and taxonomy studies. The method consists of the

analysis of several conserved housekeeping genes dispersed in at least 100 kb of the genome (4, 6, 14, 23). Successful definitions of phylogenetic groups of rhizobia have also been achieved with the use of the MLSA (27, 29, 34).

Microbial biodiversity in the tropics has been often claimed as a major global treasure, albeit poorly characterized. Tropical rhizobia represent a key component for the sustainability of tropical soils, and the few results obtained so far clearly indicate that diversity is largely underestimated within the *Bradyrhizobium* genus (13, 26, 27). Therefore in this study the MLSA approach was applied to achieve a better phylogenetic resolution of twelve strains showing high genetic diversity of the 16S rRNA gene in relation to the described *Bradyrhizobium* species. The objective is to delineate strategies which may help to more promptly define diversity of tropical *Bradyrhizobium*.

Material and Methods

Strains

Twelve *Bradyrhizobium* strains were used in this study and are listed in Table 1. The strains were chosen from previous studies from our group (3, 13, 26, 27, 35), based on the high level of genetic diversity observed in comparison to the described species of *Bradyrhizobium*. The strains have been isolated from members of two subfamilies and five tribes of the family Leguminosae, and originated from four countries located in different continents: Australia, Brazil, Malaysia and Zimbabwe (Table 1). Preparation of stock cultures, strains growth conditions and maintenance were performed as described before (26). The strains are deposited at the “Culture Collection of Diazotrophic and PGPR Bacteria” of Embrapa Soja (<http://www.bmrc.Incc.br>). Strains are also deposited at the Brazilian official culture collection “SEMIA” of rhizobial strains (IBP World Catalogue of *Rhizobium* Collections n°443 in the WFCC World Data Center on Microorganisms).

DNA extraction and sequencing analysis of the 16S rRNA

Total genomic DNA was extracted as described by Menna et al. (26). The DNAs were submitted to the amplification with primers for the 16S rRNA, *recA*,

atpD, *glnII*, *gyrB* and *rpoB*, as listed in Table 2. The PCR products were purified with the PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), and the reactions for the sequencing analysis were performed as described by Menna et al. (26). The sequencing was performed on a MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences) capillary sequencer, as described before (26).

Cluster analyses

The 16S rRNA, *recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB* and *rpoB* sequences generated were analyzed with the programs Phred (8, 9), Phrap (<http://www.phrap.org>) and Consed (15). The consensus sequences obtained and confirmed in the 5' and 3' directions were submitted to the GenBank database and received the accession numbers listed in Table 3. Some genes have been previously sequenced by our group, but were re-sequenced in this study. The identities were confirmed in 100%, therefore their original accession numbers were maintained (Table 3). Sequences for other reference/type strains were retrieved from the GenBank database and are also listed in Table 3. *Caulobacter crescentus* strain CB 15 (genome, AE005673), was used as an outgroup.

The MLSA analysis was performed considering only the complete aligned sequences (size among parenthesis) obtained for the *Bradyrhizobium* strains and for the type/reference strains retrieved from GenBank: 16S rDNA (1,347 bp), *recA* (293 bp), *atpD* (395 bp), *glnII* (442 bp), *gyrB* (434 bp) and *rpoB* (672 bp).

All sequences obtained in this study or retrieved from GenBank were analyzed individually and concatenated using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 4.0 with the default parameters, K2P distance model (19), and the Neighbor-Joining algorithm (36). Statistical support for tree nodes was evaluated by bootstrap (10) analyses with 1000 samplings (16).

Results

Diversity in the 16S rRNA

The phylogenetic tree built with the 16S rRNA sequences split the *Bradyrhizobium* strains in two large groups, with final bootstrap supports for each group of 70 and 94%, respectively (Fig. 1). The first group (G-I) comprised eight SEMIA strains, all grouped with *B. elkanii* and also with *B. pachyrhizi* and *B. jicamae*. The second group (G-II) included SEMIAs 6395, 656, 6002 and 6144 showing closer relation with *B. iriomotense*, in addition to reference/type strains of *B. betae*, *B. canariense*, *B. yuanmingense*, *B. liaoningense* and *B. japonicum*. Fig. 1 also highlights that grouping of the SEMIA strains was not clearly evidenced from the analysis of the 16S rRNA.

Diversity in the *atpD*, *glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoB* genes

The additional housekeeping genes selected to refine the phylogeny analysis in this study are highly conserved among bacteria of the order Rhizobiales, are dispersed in the genome of *B. japonicum* strain USDA 110 and encode important proteins. For each housekeeping gene, phylogenetic trees were constructed and resulted in distinct groups (Fig. 2).

When compared to 16S rRNA, higher variability was detected in the analysis of the *recA* gene, and strains also fit into two groups (Fig. 2A). All four strains previously positioned in G-II of the 16S rRNA were closer to *B. iriomotense*, but with the appearance of at least one subgroup including SEMIA 6002 and SEMIA 6144 strains. This first group of strains had a high bootstrap support, of 99%. Subgroups were even more evident with the strains previously positioned in G-I of the 16S rRNA, with the delineation of four subgroups based on the *recA* gene: one including strains SEMIAs 6160, 662 and *B. pachyrhizi*, the second with SEMIA 696 and *B. elkanii* and two new subgroups including exclusively SEMIA strains, one with SEMIAs 6148 and 6154 and the other with SEMIAs 6028, 6053 and 6145. These subgroups had bootstrap supports ranging from 81 to 99% (Fig. 2A).

Greater variability was also observed with *atpD* gene (Fig. 2B), when compared to the 16S rRNA. The tree built with the *atpD* gene resulted in the

definition of three main groups (G-I, G-II and G-III), with a final bootstrap support of 81%. Although the DNA of strain SEMIA 696 was successfully amplified with the *atpD* primers, sequencing was very poor, therefore the strain was not included in the analysis. In G-I, strains were split in two subgroups, the first clustering four strains with higher resemblance with *B. elkanii*, and the second with three strains grouping with *B. pachyrhizi* (Fig. 2B). The other four SEMIA strains from this study were positioned in G-III of the *atpD* tree, with SEMIA 6395 showing higher similarity with *B. betae*, while the other strains were grouped with *B. liaoningense* (Fig. 2B).

The tree built with *glnII* gene also resulted in two groups. In G-I four SEMIA strains were clustered with *B. pachyrhizi*, SEMIA 696 was clustered with *B. elkanii*, followed by the inclusion of SEMIA 662 and *B. jicamae* (Fig. 2C). In G-II of the *glnII*, it is worth mentioning the clustering of strains SEMIAs 6002 and 6144 with a bootstrap support of 97% (Fig. 2C), also confirmed with high support in the previous trees of *recA* (Fig. 2A) and *atpD* (Fig. 2B), but not well defined in the 16S rRNA (Fig. 1). It is also interesting to comment that *B. pachyrhizi* and *B. elkanii* were positioned in the same group in the analysis of the 16S rRNA, *recA*, *atpD* and *glnII* (Fig. 1 and Figs. 2A to 2C). On the other hand, definition of the other *Bradyrhizobium* species considered in this study was not completely clear when considering both housekeeping (Figs. 2A to 2C) and the 16S rRNA (Fig. 1).

Unfortunately in the analysis of *gyrB* and *rpoB* the sequences of *B. pachyrhizi*, *B. jicamae* and/or *B. iriomotense* were not available at the GenBank. In general clustering of strains positioned in G-I of the 16S rRNA (Fig. 1) was not improved in the analysis of *gyrB* (Fig. 2D) and *rpoB* (Fig. 2E). In both trees clustering of strains in one of the two great groups was similar to the clustering with the 16S rRNA.

From the analysis of the 16S rRNA (Fig. 1) and of five housekeeping genes (Fig. 2), the division of *Bradyrhizobium* in two main groups was clear, with the appearance of a third group not completely well defined only in the tree built with the *atpD* gene. Each SEMIA strain used in our study was always positioned in the same great group in all six trees.

Concatenated analysis of *recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB* and *rpoB*

All five sequences of the housekeeping genes were concatenated to gain a better understanding of the strains; SEMIA 696 was not included in this analysis. A concatenated sequence with 2,236 bp was obtained and 2,313 sites were analysed, resulting in 1,797 conserved, 439 variable and 294 parsimony-informative sites (Table 4).

The tree built with the concatenated genes resulted in two great groups, with a bootstrap support of 100% (Fig. 3). G-I assembled SEMIAs 656, 6395, 6002 and 6144 together with type/reference strains of *B. yuanmingense*, *B. liaoningense*, *B. japonicum*, *B. betae* and *B. canariense*. Within G-I, subclusters that were not well defined in the 16S rRNA (Fig. 1) tree were now shown (Fig. 3), including the pairs of strains SEMIAs 656-6395 and SEMIAs 6002-6144, with bootstrap supports of 93 and 100%, respectively. The concatenated tree has also allowed the detection of higher diversity of the strains occupying G-II. Emphasis should also be given to strains SEMIAs 6028, 6160, 6053 and 6145, which deserve further studies, as they may represent new species. Finally, it is important to mention that in all trees *Bradyrhizobium* was clearly apart from the other rhizobial genera.

Another important observation is that clustering of strains by means of both 16S rRNA and housekeeping genes showed no relation with the host plant. Strains clustered in G-I of the MLSA were isolated from subfamilies Papilionoideae (SEMIAs 656, 6002 and 6144) and Mimosoideae (SEMIA 6395), and G-II also included strains from both subfamilies. Another example refers to isolates from *Vigna*, clustered in both G-I (SEMIA 6002) and G-II (SEMIA 662). As a final example, isolates from tribe Ingeae were also clustered in both G-I (SEMIA 6395) and G-II (SEMIA 6160) of the MLSA (Fig. 3).

Discussion

Bradyrhizobium is an intriguing genus of bacteria encompassing a number of interesting features. First, the genus has been considered as the ancestor of all rhizobia (22, 30, 33, 46), and it has been isolated from a variety of legumes distributed worldwide. However, most reports on diversity and genetics of diazotrophic symbiotic bacteria have been performed with fast-growing rhizobia, thus

studies with *Bradyrhizobium* may reveal new insights into the evolution of rhizobia. The second important feature is that *Bradyrhizobium* has probably originated in the tropical region (22, 30), and indeed bradyrhizobia seem to represent the majority of the isolates from leguminous trees in Brazilian tropical forests (28). As it has been pointed out since the pioneer studies of ribosomal genes, apparently there are many more varieties of rhizobia in tropical and subtropical than in temperate regions (31, 43); therefore, studies on the genetic diversity of *Bradyrhizobium* may expose a high level of genetic diversity. Finally, the third important feature relies on the reports that the highest rates of nitrogen fixation reported so far have always been related to bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium*, and excellent examples comprise the symbioses with cowpea (*Vigna* spp.) and soybean (*Glycine max*). Indeed, the SEMIA strains used in our study are highly effective in fixing nitrogen with their host plants.

Previous studies from our group employing analyses of the 16S rRNA, 23S rRNA, ITS and housekeeping genes have indicated an unexpected genetic diversity of *Bradyrhizobium* (13, 26, 27). In our study the use of five housekeeping genes in the MLSA approach highlighted a far higher diversity in comparison to the single analysis with the 16S rRNA, clearly indicating putative new species.

DNA-DNA hybridization is still required to define new species (12), but arguments against its obligatory use have been raised, including: high cost and intensive work (5, 42), existence of more accurate approaches (20), doubts about its adequacy (1). MLSA has then been proposed as a more accessible tool for assessing phylogeny and taxonomy of prokaryotes (4, 6, 14, 23). Also in this context, the use of at least four housekeeping genes for the phylogenetic analysis and taxonomic classification of bradyrhizobia has been proposed (27, 32, 37, 38, 45) and confirmed as a successful approach in our study.

It is also interesting to comment that host specificity was not related to genetic clustering, confirming previous reports from our group (3, 13, 26, 27, 35), and indicating that other genes must be searched aiming at getting a better understanding of the evolution of the symbioses, probably nodulation and nitrogen fixation genes.

Nitrogen is often the most limiting nutrient for plant growth worldwide and the situation is especially critical in the tropics, where the majority of the soils are

depleted of nutrients and N-fertilizers are very expensive. In such scenario biological nitrogen fixation plays a key role. The results from our study highlight the high genetic variability associated with *Bradyrhizobium* microsymbionts of a variety of legumes. Our results confirm that the MLSA approach can represent an important, effective, fast and low-cost strategy to reveal the still poorly known diversity of *Bradyrhizobium* and certainly other nitrogen-fixing rhizobial species (24, 27, 34, 38, 44). In our study MLSA clearly contributed to a better phylogeny definition, as well as to the identification of new subgroups indicative of new species.

Acknowledgments

The work was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CNPq-PNPD (558455/2008-5), CNPq/MCT/MAPA (577933/2008) and CNPq-Universal (470162/2009).

References

1. Achtman, M.; Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 431-440.
2. Beijerinck, M.W. (1888). Cultur des *Bacillus radicolica* aus den Knöllchen. *Bot. Ztg.* 46, 740-750.
3. Binde, D.R.; Menna, P.; Bangel, E.V.; Barcellos, F.G.; Hungria, M. (2009). rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 897-908.
4. Brett, P.J.; Deshazer, D.; Woods, D.E. (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 317-320.
5. Coenye, T.; Gevers, D.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Swings, J. (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 147-167.
6. Cooper, J.E.; Feil, E.J. (2004). Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373-377.
7. DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). 2010. Available at: <http://www.dsmz.de/index.htm>. Accessed 11 Nov 2010.

8. Ewing, B.; Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-194.
9. Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175-185.
10. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.
11. Fred, E.B.; Baldwin, I.L.; McCoy, E. (1932). *Root Nodule Bacteria of Leguminous Plant*. Madison: University of Wisconsin Press.
12. Garrity, G.M.; Holt, J.G. (2001). The roadmap to the manual. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds). 2ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, USA, p.119-166.
13. Germano, M.G.; Menna, P.; Mostasso, F.L.; Hungria, M. (2006). RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 217-229.
14. Godoy, D.; Randle, G.; Simpson, A.J.; Aanensen, D.M.; Pitt, T.L.; Kinoshita, R.; Spratt, B.G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2068-2079.
15. Gordon, D.; Abajian, C.; Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8, 195-202.
16. Hedges, S.B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p-value in phylogenetic studies *Mol. Biol. Evol.* 9, 366-369.
17. Jordan, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 136-139.
18. Jordan, D.C. (1984). Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkens Co., Baltimore, USA, p.234-235.
19. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
20. Konstantinidis, K.T.; Tiedje, J.M. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 3160-3165.
21. Kuykendall, L.D.; Saxena, B.; Devine, T.E.; Udell, S.E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501-505.

22. Lloret, L.; Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47, 43-60.
23. Maiden, M.C.J.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; other authors (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3140-3145.
24. Martens, M.; Delaere, M.; Coopman, R.; de Vos, P.; Gillis, M.; Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 489-503.
25. Martens, M.; Dawyndt, P.; Coopman, R.; Gillis, M.; De Vos, P.; Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 200-214.
26. Menna, P.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Bangel, E.V.; Hess, P.N.; Martínez-Romero, E. (2006). Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 315-332.
27. Menna, P.; Barcellos, F.G.; Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934-2950.
28. Moreira, F.M.S. (1991). *Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica*. Rio de Janeiro, Brasil. (Ph.D. Thesis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. UFRRJ).
29. Moulin, L.; Béna, G.; Boivin-Masson, C.; Stepkowski, T. (2004). Phylogenetic analysis of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 720-732.
30. Norris, D.O. (1965). Acid production by *Rhizobium*: a unifying concept. *Plant Soil.* 22, 143-166.
31. Oyaizu, H.; Naruhashi, N.; Gamou, T. (1992). Molecular methods of analysing bacterial diversity: the case of rhizobia. *Biodivers. Conserv.* 1, 237-249.
32. Parker, M.A. (2004). rRNA and *dnaK* relationships of *Bradyrhizobium* sp. nodule bacteria from four Papilionoid legume trees in Costa Rica. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 334-342.
33. Provorov, N.A.; Vorob'ev, N.I. (2000). Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and populational aspects. *Russ. J. Genet.* 36, 1323-1335.
34. Ribeiro, R.A.; Barcellos, F.G.; Thompson, F.L.; Hungria, M. (2009). Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean

- (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol.* 160, 297-306.
35. Roma Neto, I.V.; Ribeiro, R.A.; Hungria, M. (2010). Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1291-1302.
 36. Saitou, N.; Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 37. Stepkowski, T.; Czaplińska, M.; Miedzinska, K.; Moulin, L. (2003). The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 483-494.
 38. Stepkowski, T.; Moulin, L.; Krzyzanska, A.; McInnes, A.; Law, I.J.; Howieson, J. (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7041-7052.
 39. Tesfaye, M.; Holl, F.B. (1998). Group-specific differentiation of *Rhizobium* from clover species by PCR amplification of 23S rDNA sequences. *Can. J. Microbiol.* 44, 1102-1105.
 40. van Berkum, P.; Fuhrmann, J.J. (2000). Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2165-2172.
 41. van Berkum, P.; Terefework, Z.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Lindstrom, K.; Eardly, B.D. (2003). Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* 185, 2988-2998.
 42. Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.
 43. Vinuesa, P.; Rademaker, J.L.W.; de Bruijn, F.J.; Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2096-2104.
 44. Vinuesa, P.; León-Barrios, M.; Silva, C.; Willems, A.; Jarabo-Lorenzo, A.; Pérez-Galdona, R.; Werner, D.; Martínez-Romero, E. (2005a). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569-575.

45. Vinuesa, P.; Silva, C.; Werner, D.; Martínez-Romero, E. (2005b). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 29-54.
46. Wang, E.T.; Martínez-Romero, E. (2000). Phylogeny of root-and stem-nodule bacteria associated with legumes. *In: Triplett, E.W. (ed). Prokaryotic Nitrogen Fixation: a model system for analysis of a biological process*, Horizon Scientific, Wymondham, UK, p.177-186.
47. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
48. Willems, A.; Doignon-Bourcier, F.; Goris, J.; Coopman, R.; de Lajudie, P.; De Vos, P.; Gillis, M. (2001). DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1315-1322.
49. Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

Figure Legends

Figure 1 – Phylogenetic relationships of *Bradyrhizobium* strains from this study and of reference/type rhizobial strains based on the 16S rRNA. Phylogeny was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4.

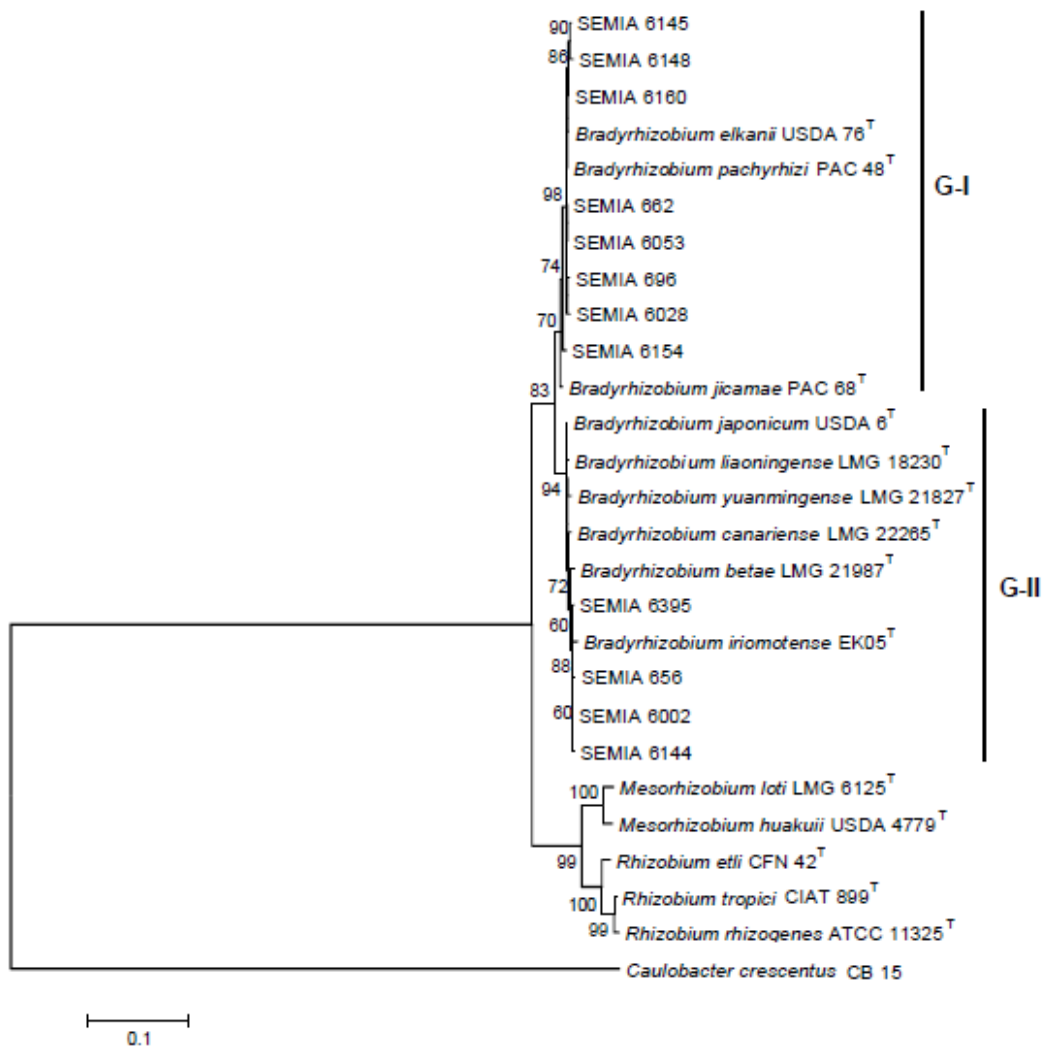


Figure 2 – Phylogenetic relationships of *Bradyrhizobium* strains from this study and of reference/type rhizobial strains based on the (a) *recA*, (b) *atpD*, (c) *glnII*, (d) *gyrB* and (e) *rpoB* genes. Method and parameters of analysis were as described for Figure 1

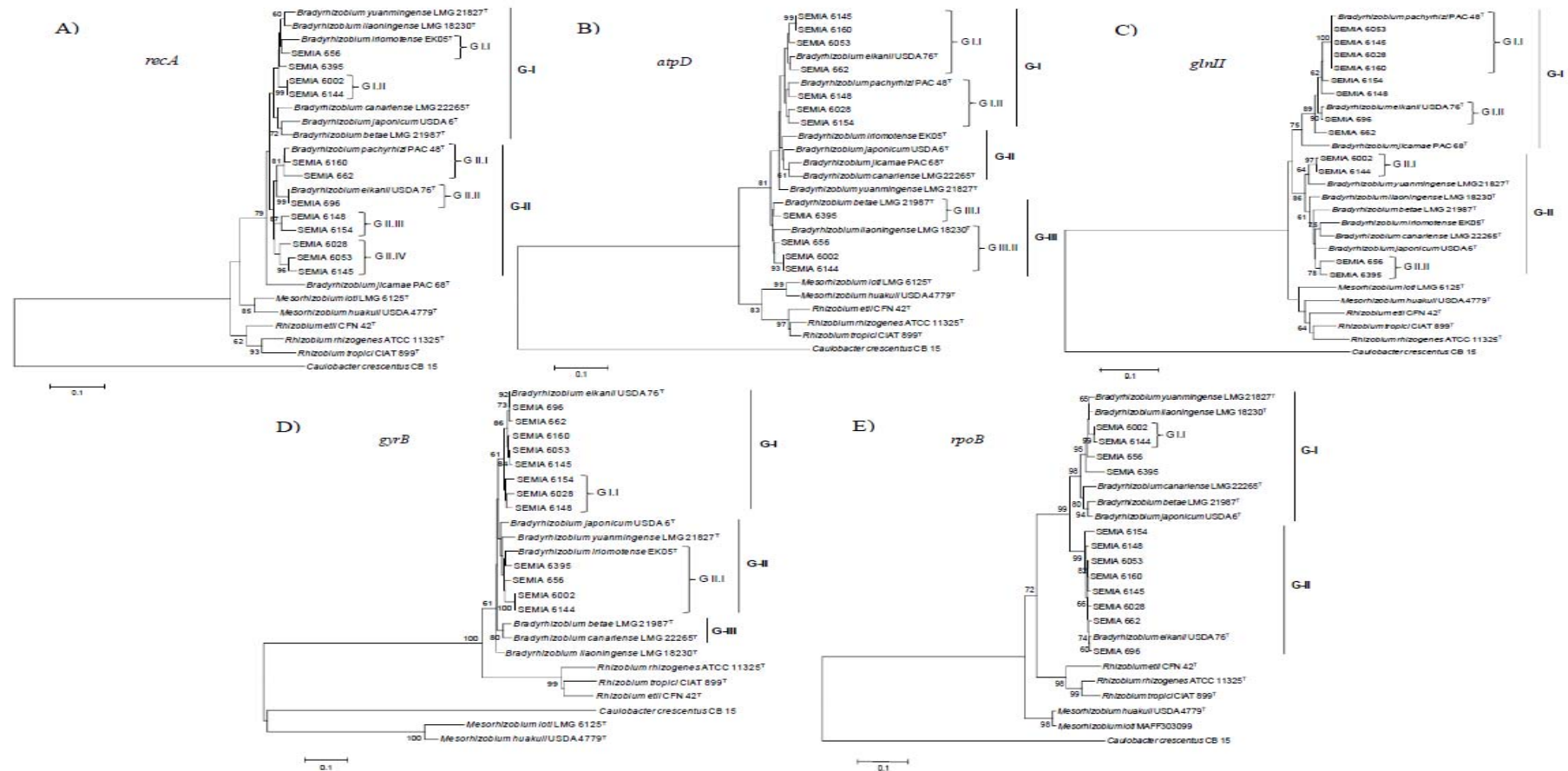


Figure 3 – Evolutionary tree inferred using the Neighbor-Joining method for 22 strains based on concatenated genes (*recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB*). The percentage of replicate trees in which the associated strains clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4.



Table 1 – Information about the *Bradyrhizobium* strains from the Embrapa Soybean culture collection used in this study

SEMIA number	Other designations ^a	Origin of the strain	Country of origin	Host species ^b	Subfamily ^b	Tribe ^b	Previous studies ^c
656	SEMIA original, CNPSo 988	FEPAGRO	Brazil	<i>Neonotonia wightii</i> (Wight & Arn.) Lackey	Papilionoideae	Phaseoleae	a, b, d
662	CB 188, CNPSo 990	CSIRO	Australia	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	Papilionoideae	Phaseoleae	a, b, d
696	CB 627, CNPSo 993	CSIRO	Australia	<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.) DC	Papilionoideae	Demodieae	a, b, d, e
6002	CB 756, TAL 309, RCR 3824, CNPSo 1092	CSIRO	Zimbabwe	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	Papilionoideae	Phaseoleae	a, b, d
6028	TAL 569, SPRL 472, MAR 472, CNPSo 1094	NIFTAL	Zimbabwe	<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.) DC	Papilionoideae	Demodieae	a, b, d
6053	TAL 827, UMKL 28, CNPSo 1095	NIFTAL	Malaysia	<i>Clitoria ternatea</i> L.	Papilionoideae	Phaseoleae	a, b, d, e
6144	SMS 400, USDA 3187, MAR 11, CNPSo 1109	IAC	Zimbabwe	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Papilionoideae	Aeschynomeneae	a, b, d
6145	BR 2001, CNPSo 1110	Embrapa Agrobiologia IAC	Brazil	<i>Crotalaria juncea</i> L.	Papilionoideae	Crotalariaeae	a, b, d
6148	SMS 303, CNPSo 1112	IAC	Brazil	<i>Neonotonia wightii</i> (Wight & Arn.) Lackey	Papilionoideae	Phaseoleae	a, b, d
6154	BR 446, CNPSo 1117	Embrapa Agrobiologia	Brazil	<i>Stylosanthes</i> spp.	Papilionoideae	Aeschynomeneae	a, c, e
6160	BR 5610, CNPSo 1123	Embrapa Agrobiologia	Brazil	<i>Albizia lebbeck</i> (L.) Benth.	Mimosoideae	Ingeae	a, b, d
6395	BR 4301, CNPSo 1161	Embrapa Agrobiologia	Brazil	<i>Calliandra houstoniana</i> (Mill.) Standl.	Mimosoideae	Ingeae	c

a Culture collections: BR (Brazil, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Brazil); CB (Commonwealth Scientific and Industrial a Research Organization – CSIRO, Canberra, Australia); CNPSo (Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Brazil); MAR (Marondera, Grasslands *Rhizobium* Collection, Soil Productivity Research Laboratory, Marondera, Zimbabwe; also called SPRL); SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola, FEPAGRO, Porto Alegre, Brazil); SMS (Seção de Microbiologia do Solo, IAC, Campinas, Brazil); TAL (NifTAL, Nitrogen Fixation by Tropical Agricultural Legumes Project, University of Hawaii, Paia, USA); USDA (United States Department of Agriculture, Beltsville, USA)

b Taxonomy based on ILDIS (www.ildis.org)

c Previous studies with the strains: (a) Germano *et al.* (2006); (b) Menna *et al.* (2006); (c) Binde *et al.* (2009); (d) Menna *et al.* (2009); (e) Roma Neto *et al.* (2010)

Table 2 – Primers and DNA amplification conditions used in this study

Primer	Sequence (5'-3') ^a	Target (position) †	gene	PCR cycling	Reference
TSrecAf	CAACTGCMYTGC GTATCGTCGAAG G	<i>recA</i> (8-32)		2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C and 7 min 72°C.	Stepkowski <i>et al.</i> (2005)
TSrecAr	CGGATCTGGTTG ATGAAGATCACC ATG	<i>recA</i> (620-594)			
TSatpDf	TCTGGTCCGYGG CCAGGAAG	<i>atpD</i> (189-208)		2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C and 7 min 72°C.	Stepkowski <i>et al.</i> (2005)
TSatpDr	CGACACTTCCGA RCCSGCCTG	<i>atpD</i> (804-784)			
TSglnIf	AAGCTCGAGTAC ATCTGGCTCGAC GG	<i>glnII</i> (13-38)		2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C and 7 min 72°C.	Stepkowski <i>et al.</i> (2005)
TSglnIir	SGAGCCGTTCCA GTCGGTGTCG	<i>glnII</i> (681-660)			
gyrB343F	TTCGACCAGAAY TCCTAYAAGG	<i>gyrB</i> (343-364)		5 min 95°C, 5X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 X (30s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C and 5 min 72°C.	Martens <i>et al.</i> (2008)
gyrB1043R	AGCTTGTCCTTS GTCTGCG	<i>gyrB</i> (1061-1043)			
rpoB83F	CCTSATCGAGGT TCACAGAAGGC	<i>rpoB</i> (83-103)		5 min 95°C, 3X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 30 X (30s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C and 5 min 72°C.	Martens <i>et al.</i> (2008)
rpoB1061R	AGCGTGTTGCGG ATATAGGCG	<i>rpoB</i> (1081-1061)			
fD1	AGAGTTTGATCC TGGCTCAG	16S rRNA(9-29)		2 min 95°C, 30 X (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C and 5 min 72°C.	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
rD1	CTTAAGGAGGTG ATCCAGCC	16S rRNA (1474- 1494)			

^a Mixtures of bases used at certain positions are given as: K, T or G; S, G or C; Y, C or T; R, A or G; M, A or C

† Position of the primer in the corresponding sequence of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

Table 3 – GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of the *Bradyrhizobium* strains used in this study and of the reference/type strains

Strain	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>
<i>Bradyrhizobium</i> strains						
SEMIA 656	AY904732 ^a	FJ391146 ^c	FJ390946 ^c	FJ391026 ^c	HQ634882 ^e	HQ634901 ^e
SEMIA 662	AY904734 ^a	HQ634894 ^e	HQ634871 ^e	HQ634877 ^e	HQ634883 ^e	HQ634902 ^e
SEMIA 696	AY904736 ^a	HQ634895 ^e		GQ160506 ^d	HQ634884 ^e	HQ634903 ^e
SEMIA 6002	AY904743 ^a	HQ634896 ^e	HQ634872 ^e	HQ634878 ^e	HQ634885 ^e	HQ634904 ^e
SEMIA 6028	AY904744 ^a	FJ391159 ^c	FJ390959 ^c	FJ391039 ^c	HQ634886 ^e	HQ634905 ^e
SEMIA 6053	AY904745 ^a	FJ391160 ^c	FJ390960 ^c	FJ391040 ^c	HQ634887 ^e	HQ634906 ^e
SEMIA 6144	AY904750 ^a	HQ634897 ^e	HQ634873 ^e	HQ634879 ^e	HQ634888 ^e	HQ634907 ^e
SEMIA 6145	AY904751 ^a	HQ634898 ^e	HQ634874 ^e	HQ634880 ^e	HQ634889 ^e	HQ634908 ^e
SEMIA 6148	AY904753 ^a	FJ391168 ^c	FJ390968 ^c	FJ391048 ^c	HQ634890 ^e	HQ634909 ^e
SEMIA 6154	FJ025100 ^b	HQ634899 ^e	HQ634875 ^e	GQ160500 ^d	HQ634891 ^e	HQ634910 ^e
SEMIA 6160	AY904762 ^a	FJ391171 ^c	FJ390971 ^c	FJ391051 ^c	HQ634892 ^e	HQ634911 ^e
SEMIA 6395	FJ025101 ^b	HQ634900 ^e	HQ634876 ^e	HQ634881 ^e	HQ634893 ^e	HQ634912 ^e
Reference/type strains						
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	AY372184 ^f	AB353734 ^f	FM253129 ^f	AB353733 ^f	FM253217 ^f	FM253260 ^f
<i>B. jicamae</i> PAC 68 ^T	AY624134 ^f	HM047133 ^f	FJ428211 ^f	FJ428204 ^f	n.a.	n.a.
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	AY624135 ^f	HM047130 ^f	FJ428208 ^f	FJ428201 ^f	n.a.	n.a.
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	AJ558025 ^f	FM253177 ^f	AY386739 ^f	AY386765 ^f	FM253220 ^f	FM253263 ^f
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T	AF193818 ^f	AM168343 ^f	AY386760 ^f	AY386780 ^f	FM253226 ^f	FM253269 ^f
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	AF208513 ^f	AY591564 ^f	AY386752 ^f	AY386775 ^f	FM253223 ^f	FM253266 ^f
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	U35000 ^f	AY591568 ^f	AY386758 ^f	AY599117 ^f	AM418800 ^f	AM295348 ^f
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	X66024 ^f	AM182158 ^f	AM168320 ^f	AF169582 ^f	AM418801 ^f	AM295349 ^f
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	AB300992 ^f	AB300996 ^f	AB300994 ^f	AB300995 ^f	AB300997 ^f	n.a.
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	EU488752 ^f	EU488815 ^f	AM418789 ^f	EU488791 ^f	AM418836 ^f	AM295354 ^f
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	EU488751 ^f	EU488824 ^f	*NC_007761 ^f	EU488776 ^f	*NC_007761 ^f	*NC_007761 ^f
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	AY945955 ^f	AM182126 ^f	AM418786 ^f	FJ816281 ^f	AM418833 ^f	AM295353 ^f
<i>Mesorhizobium loti</i> LMG 6125 ^T	X67229 ^f	AM182156 ^f	AM946552 ^f	AF169581 ^f	EU273810 ^f	*BA000012.4 ^f
<i>Mesorhizobium huakuii</i> USDA 4779 ^T	D13431 ^f	AJ294370 ^f	AJ294394 ^f	AF169588 ^f	AM076344 ^f	FJ393283 ^f

a From the study by Menna *et al.* (2006); b From the study by Binde *et al.* (2009); c From the study by Menna *et al.* (2009); d From the study by Roma Neto *et al.* (2010); e From this study; f From the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov); * Genome.

n.a. not available

Table 4 – Sequence information obtained in this study

Twelve strains were analysed, together with six, seven or nine type and reference strains, as described in Methods.

Locus	Strains analysed (n)	Nucleotides (%)				Frequency T/C/A/G (%)
		Conserved	Variable	Parsimony- informative	Total*	
16S rRNA	21	1,266 (91,5)	86 (6,2)	52 (3,7)	1,347/1,383	20.4/24.0/24.7/30.9
<i>atpD</i>	20	318 (77,6)	77 (18,8)	57 (13,9)	395/410	15.7/33.3/19.6/31.3
<i>glnII</i>	21	334 (72,8)	108 (23,5)	77 (16,8)	442/459	16.2/32.7/19.9/31.2
<i>gyrB</i>	19	348 (77,2)	86 (19,1)	54 (12)	434/451	21.7/29.8/16.4/32.0
<i>recA</i>	21	217 (72,6)	76 (25,4)	52 (17,4)	293/299	15.8/32.3/17.3/34.7
<i>rpoB</i>	18	546 (78,9)	126 (18,2)	75 (10,8)	672/692	17.1/32.6/20.0/30.3
Concatenated genes	17	1,797 (77,7)	439 (19)	294 (12,7)	2,236/2,313	17.4/32.2/18.9/31.6

* Mean number of nucleotides amplified/number of sites analysed, including gaps.

6 CONCLUSÕES

- A análise dos genes *housekeeping* (*atpD*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoB*) revelou uma elevada diversidade genética em estirpes de *Bradyrhizobium*, não observada pela análise do gene 16S RNAr.

- A análise das sequências dos genes concatenados (MLSA) permitiu identificar possíveis novas espécies de *Bradyrhizobium*.

- A técnica de MLSA representa uma estratégia rápida e eficaz para o estudo taxonômico e filogenético de *Bradyrhizobium* e certamente de outros rizóbios fixadores de nitrogênio.