



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS
MICROSSIMBIONTES DE FEJJOEIRO (*PHASEOLUS
VULGARIS* L.)**

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS
MICROSSIMBIONTES DE FEIJOEIRO (*PHASEOLUS
VULGARIS* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Dra. 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)

R484ta Ribeiro, Renan Augusto.
Taxonomia e filogenia molecular de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Renan Augusto Ribeiro. – Londrina, 2011.
91 f.: il.

Orientador: Mariangela Hungria da Cunha.
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.
Inclui bibliografia

1. Rizóbio – Teses. 2. Rizóbio – Filogenia – Teses. 3. Taxonomia vegetal – Teses. 4. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. I. Cunha, Mariangela Hungria da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.841.3

RENAN AUGUSTO RIBEIRO

**TAXONOMIA E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS
MICROSSIMBIONTES DE FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Dra Mariangela Hungria da Cunha – Embrapa Soja
UEL – Londrina – PR

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

Dr. Marco Antônio Nogueira – Embrapa Soja
UEL – Londrina – PR

Dra Diva de Souza Andrade – IAPAR
UEL – Londrina – PR

Dr. Fernando Gomes Barcellos
UNIPAR – Umuarama – PR

Londrina, 30 de maio 2011.

Dedico

*Aos meus pais (Norberto e Sonia), pela dedicação
por toda a vida e à minha esposa Camila pelo
companheirismo, dedicação e amor. Amo vocês*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar força para continuar lutando e vencendo todos os obstáculos.

A minha orientadora e madrinha Mariangela, que sempre acreditou no meu trabalho, me dando oportunidades, incentivando e não me deixando desistir do meu longo caminho de vida acadêmica. Esteve ao meu lado para que este trabalho se realizasse e que é exemplo a ser seguidos tanto como pessoa quanto profissionalmente. Obrigado pela oportunidade e pela amizade, de todo coração.

À minha esposa Camila, pelo amor dedicado durante todo o tempo, por me fazer cada dia mais feliz e por ser uma pessoa que tanto admiro e que tenho orgulho de ter encontrado para ser minha esposa.

A toda minha família, em especial aos meus pais e meus irmãos (Victor e Matheus), que são minha fortaleza e meu refugio nos momentos mais difíceis e que sempre acreditaram em mim.

Aos membros da banca, Dr. Fernando Gomes Barcellos, Dra. Diva Andrade, Dr. Marco Antonio Nogueira e à Dra. Pamela Menna, pela disponibilidade em participar desse momento importante da minha vida e também pela grande amizade.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa, que direta ou indiretamente participaram dessa conquista: Jakeline, Adriana, Ligia, Letícia, Renata, Marquito, Jesiane, Gesiele, Douglas, Soledade, Maria, Adalgisa, Leopoldo, Rebeca, Dáfila, Vívian, Hosana, Josiane, Eduara, Rinaldo, Juscelio, Bettina, Talita, Artur e dona Rosa que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta conquista, seja em momentos de discussões científicas seja nos altos e baixos do nosso dia a dia. Obrigado por tudo!!

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

À Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ribeiro, Renan Augusto. **Taxonomia e filogenia molecular de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa que foi originalmente domesticada nas Américas Central e do Sul. Os rizóbios são bactérias que vivem em simbiose com algumas leguminosas, resultando em um complexo processo denominado fixação biológica de nitrogênio. Apesar da alta diversidade procariótica presente no solo, o grande desafio consiste em identificar e classificar um número cada vez maior de microrganismos, de modo que se consiga extrair ao máximo o potencial tecnológico dessas bactérias em favor de um incremento no rendimento das culturas e na sustentabilidade da agricultura. Os estudos taxonômicos possuem um papel fundamental para a classificação dessa biodiversidade. Atualmente, a filogenia dos procariotos é baseada principalmente no gene 16S RNAr, embora alguns estudos tenham demonstrado que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrer transferência horizontal e recombinação genética, fazendo com que os resultados nem sempre possam refletir a verdadeira filogenia procariótica. Além disso, o gene 16S RNAr apresenta um nível elevado de conservação, dificultando a identificação e classificação taxonômica para grupos de microrganismos intimamente relacionados. Com isso, a técnica de MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*), que consiste na análise concatenada de pelo menos cinco genes conservados e que estejam presentes em todos os organismos em análise, vem sendo empregada para conferir maior confiabilidade a estudos taxonômicos e de filogenia. No primeiro trabalho desta tese foi realizado um estudo polifásico, incluindo caracterização morfo-fisiológica, genética por rep-PCR e MLSA e hibridização DNA-DNA, com o objetivo de reclassificar as estirpes hoje denominadas como *R. tropici* tipo A, em uma nova espécie, *R. leucaenae*, sendo a estirpe CFN 299T proposta como estirpe tipo da nova espécie. No segundo trabalho, foram utilizadas quinze estirpes de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro provenientes do México, Equador e Brasil, com o objetivo de correlacioná-las taxonomicamente e filogeneticamente, através da técnica de MLSA. As análises dos cinco genes (*recA*, *rpoA*, *gltA*, *glnII*, *gyrB*), além do 16S RNAr indicaram a formação de três grupos principais envolvendo essas estirpes. Oito estirpes ficaram agrupadas com *R. etli* e *R. leguminosarum*, que por serem duas espécies intimamente relacionadas evolutivamente, só foram claramente separadas e identificadas na árvore concatenada com os cinco genes. Três estirpes agruparam com *R. tropici*, com nítida separação entre os tipos A (agora proposto como *R. leucaenae*) e B, principalmente na árvore concatenada. Outras quatro estirpes foram posicionadas no grupo de *R. radiobacter*, mas pela grande distância evolutiva apresentada, podem ser representantes de uma nova espécie. Em ambos os trabalhos a técnica de MLSA demonstrou ser uma ferramenta rápida e confiável para a identificação precisa e consistente quando comparada à utilização de apenas um gene, principalmente dentro do grupo dos rizóbios.

Palavras-Chave: Rizóbio. Rizóbio – Filogenia. Taxonomia vegetal. Microorganismos fixadores de nitrogênio

Ribeiro, Renan Augusto. **Taxonomy and molecular phylogeny of rhizobia microsymbionts bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume originally domesticated in Americas Central and South. Rhizobia are bacteria that live in symbiosis with legumes, resulting in a complex process called biological nitrogen fixation. Despite the high prokaryotic diversity present in the soil, a great challenge has been to identify and to classify an increasing number of microorganisms, aiming at extracting the highest biotechnological potential of these bacteria in favor of an increase in crop yields and agriculture sustainability. Taxonomic studies play a key role in the classification of biodiversity. Currently, the phylogeny of prokaryotes is mainly based on the analysis of the 16S rRNA, although some studies have shown that the ribosomal genes may occasionally undergo horizontal transfer and recombination, so that the results may not always reflect the true phylogeny of prokaryotes. In addition, the 16S rRNA gene has a high level of conservation, making the identification and taxonomic classification of groups of closely related microorganisms very difficult. Therefore, the MLSA (Multilocus Sequencing Analysis) technique, which consists of the analysis of at least five conserved genes present in all analysed microorganisms, has been used to add reliability to the taxonomy and phylogeny. In the first study of this thesis we carried out a polyphasic study, including morpho-physiological and genetic (rep-PCR and MLSA) characterization, in addition to DNA-DNA hybridization, in order to reclassify the strains now known as *R. tropici* type A. as a new species, *R. leucaenae*, with the strain CFN 299T being proposed as the type strain. In the second study, we used fifteen strains of bean rhizobia microsymbionts from Mexico, Ecuador and Brazil, in order to correlate them taxonomically and phylogenetically, by using the MLSA technique. The analysis of the five genes (*recA*, *rpoA*, *gltA*, *glnII*, *gyrB*), and the 16S rRNA indicated the formation of three main groups. Eight strains were grouped with *R. etli* and *R. leguminosarum*, which are evolutionarily closely related species and were not clearly separated and identified in the tree with the five concatenated genes. Three strains clustered with *R. tropici*, and a clear separation between types A (now proposed as *R. leucaenae*) and B was observed, especially in the concatenated tree. Four other strains were placed in the group of *R. radiobacter*, but given the large evolutionary distance, may they might well represent a new species. In both studies the MLSA technique proved to be a fast and reliable tool for accurate and consistent identification when compared to the use of only one gene, especially within the group of rhizobia.

Keywords: Rhizobia. Rhizobium - Phylogeny. Plant taxonomy. Microorganisms nitrogen fixers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hibridização DNA-DNA.....	18
Figura 2 – Relação entre similaridade por hibridização DNA-DNA (RBR) e ΔT_m	19
Figura 3 – Comparação de similaridades entre o gene ribossomal 16S e a hibridização DNA-DNA.....	22
Figura 4 – Filogenia de rizóbios (classe Alphaproteobacteria) com base na sequência do gene ribossomal 16S	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	10
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO TRABALHO 1	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO TRABALHO 2	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	O FEIJOEIRO E SUA ORIGEM.....	11
3.2	OS RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO	12
3.3	A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	14
3.4	Taxonomia e Filogenia Bacteriana	16
3.4.1	Características Fenotípicas	17
3.4.2	Características Genotípicas	18
3.4.3	Características Filogenéticas	19
3.5	TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS	25
3.6	TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS QUE NODULAM O FEIJOEIRO	27
3.7	DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE BACTERIANA	31
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	33
4	ESTUDO 1	40
	Introduction	41
	Material and Methods.....	42
	Results and Discussion.....	44
	References	49
	Supplementary Data	55
5	ESTUDO 2	62
	Introduction	64
	Material and Methods.....	65
	Results and Discussion.....	68
	References	74
6	CONCLUSÃO GERAL	91

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma importante fonte de proteína, principalmente da população mais carente na América Latina, no Sul e Oeste da África e em alguns países da Ásia (Velazquez et al., 1992; Embrapa, 2011).

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de feijão, em geral essa produção não é capaz de suprir a demanda interna e, além disso, a produtividade média nacional é uma das mais baixas do mundo (CONAB, 2011; Embrapa, 2011). Uma das maneiras de aumentar a produtividade da cultura, no Brasil, com um baixo custo para o agricultor, é pela maximização do processo de fixação biológica de nitrogênio, através de um processo denominado de fixação biológica de nitrogênio. Algumas bactérias específicas chamadas coletivamente de "rizóbios" são capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio atmosférico (N₂) com algumas espécies da família Leguminosae (Hungria et al., 1997; Menna et al., 2006). Devido ao rápido avanço da taxonomia moderna e a grande biodiversidade encontrada nos solos, a tendência é que novas bactérias sejam identificadas e descritas, aumentando as chances de descoberta de bactérias cada vez mais adaptadas e eficientes que possam ser utilizadas em inoculantes, resultando em incremento de produtividade.

A maneira como os microrganismos são diferenciados um dos outros vem mudando ao longo do tempo, e com isso, o desenvolvimento de análises cada vez mais sofisticadas nas diversas áreas, delineará o futuro da taxonomia (Gevers et al., 2006). Atualmente, a sistemática microbiana integra diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) para obter um consenso taxonômico na identificação e classificação dos microrganismos, sendo denominada de taxonomia polifásica (Vandamme et al., 1996). A atual classificação dos rizóbios, bem como para todos os procariotos, é baseada, principalmente, no gene ribossomal 16S (Garrity & Holl, 2001), embora a filogenia bacteriana baseada exclusivamente nesse gene demonstra algumas desvantagens (Martens et al., 2007; Vinuesa et al., 2005; Van Berkum et al., 2003; Sullivan et al., 1996; Gevers et al., 2005).

Sendo assim, visto ao grande número de microrganismos que ainda precisam ser identificados e classificados, e ao notável progresso nas técnicas de biologia molecular, a moderna biosistemática tem adquirido cada vez mais importância dentro da microbiologia, já que a biodiversidade procariótica está estritamente ligada à taxonomia.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar a posição taxonômica e as relações filogenéticas entre estirpes de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO TRABALHO 1

Reclassificar as bactérias designadas de *Rhizobium tropici* tipo A como uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium*.

Utilizar os métodos de taxonomia polifásica na descrição de uma nova espécie de *Rhizobium*, segundo as normas do Comitê Internacional de Sistemática Procariótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO TRABALHO 2

Utilizar a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) para definir as relações taxonômicas e filogenéticas entre 15 isolados de *Rhizobium* microssimbiontes de feijoeiro isoladas no México, no Equador e no Brasil, comparando com as estirpes-tipo de *Rhizobium* desse grupo.

Definir a diversidade genética desse grupo de isolados e avaliar a evolução das estirpes de diferentes regiões da América Latina.

Traçar possíveis rotas de migração dos rizóbios na América Latina, correlacionando com a migração do feijoeiro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O FEIJOEIRO E SUA ORIGEM

Graças às suas comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, o feijão pode ser amplamente empregado na alimentação humana, principalmente em dietas de combate à fome e à desnutrição. Além do seu conteúdo proteico, o elevado teor de fibra alimentar, com seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, aliado às vitaminas (especialmente do complexo B) e aos carboidratos, tornam o seu consumo altamente vantajoso como alimento funcional, representando importante fonte de nutrientes, de energia e atuando na prevenção de distúrbios cardiovasculares e vários tipos de câncer (Embrapa, 2011a). Devido principalmente aos aminoácidos essenciais presentes no feijão, ele é considerado a principal fonte de proteína para a população mais pobre na América latina (Velazquez et al., 1992). O consumo per capita do feijão no Brasil, de acordo com o censo de 2003, é de 16 kg/hab/ano, embora tenha atingido índices de 24 kg/hab/ano em meados da década de 1970 (Embrapa, 2011a).

Existem diversas hipóteses para explicar a origem e domesticação do feijoeiro. Tipos selvagens, similares a variedades crioulas simpátricas, encontrados no México e a existência de tipos domesticados, datados de cerca de 7.000 a.C., na Mesoamérica, suportam a hipótese de que o feijoeiro teria sido domesticado na Mesoamérica e disseminado, posteriormente, para a América do Sul. Por outro lado, em achados arqueológicos mais antigos, de cerca de 10.000 a.C., são encontrados feijões domesticados na América do Sul (sítio de Guitarrero, no Peru), representando indícios de que o feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e levado para a América do Norte (Kaplan et al., 1973; Hungria et al., 1997; Embrapa, 2011 b).

De acordo com estudos da faseolina, uma proteína encontrada no feijão com várias cópias em seu DNA, existem três centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres como cultivadas: o mesoamericano, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala (Kaplan, 1965, 1980; Kaplan et al., 1973; Embrapa 2011 b), um importante centro de domesticação ao sul dos Andes, que abrange desde o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina, do sul do Peru, ao norte da Argentina e um possível terceiro centro ao norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia e Venezuela até o norte do Peru (Gepts, 1990; Kami et al., 1995). Além destes três centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros

secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (Embrapa, 2011 b).

Atualmente o gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão Ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus*. Considerando todos os gêneros e espécies de feijoeiro, a produção mundial, segundo a FAO (2010), gira em torno de 19 milhões de toneladas, em um total de 107 países que o produzem. O Brasil se destaca como sendo o maior produtor dessa leguminosa em todo mundo, mas mesmo assim, essa produção não é suficiente para atender o mercado interno e isso devido, principalmente, a uma redução da área cultivada, que historicamente atingiu índices em torno de 6 milhões ha na década de 80, e que do ano de 2000 até os dias atuais dificilmente tem ultrapassado 4 milhões de ha (CONAB 2011). Outro fator que contribui para essa defasagem é o baixo nível de produtividade, que, de acordo com a CONAB, em 2010 foi de apenas 842 kg/ha, geralmente produzidos em pequenas e médias (10 a 100 ha) propriedades. Nessas propriedades em geral os solos contêm baixos teores de matéria orgânica e fertilidade, além de sistemas com tecnologia deficitária (Araujo, 1994). Em uma situação um pouco mais favorável, encontram-se algumas propriedades mais extensas que, por utilizarem sistemas de irrigação e altas doses de insumos, conseguem chegar a produtividades mais elevadas, como na Região Centro-Oeste, em que a produtividade média, em 2006, foi de 2087 kg/ha e na região sul, onde a produtividade no Paraná ficou em torno de 1500 kg/ha. Para atingir esse patamar de rendimento de grãos, sabe-se que o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), representa um dos principais fatores (Hungria et al., 1997).

Neste contexto, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo e capazes de melhorar os níveis de produtividade dos pequenos agricultores, responsáveis pela quase totalidade da produção desta leguminosa, que por sua vez é essencial na dieta de grande parte da população brasileira.

3.2 OS RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO

Bactérias da ordem *Rhizobiales* formam estruturas altamente específicas (nódulos) nas raízes de diversas espécies de plantas da família *Leguminosae* (= *Fabaceae*), onde ocorre a conversão do N atmosférico (N₂) a amônia, que é, então, incorporada em diversas formas de N orgânico (Hungria et al., 1997). Essa associação do rizóbio com as

raízes das leguminosas é chamada de "simbiose", termo que define um tipo de relação com benefício mútuo entre dois organismos de espécies diferentes, neste caso, a planta e a bactéria.

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. Enquanto as mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor, necessários para o processo de fixação biológica, as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria et al., 1994).

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

Os flavonoides induzem a transcrição de genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias, conduzindo à síntese e secreção dos fatores Nod. Os fatores Nod são lipooligosacarídeos responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz, alterando e aumentando o número de pelos radiculares. As bactérias atraídas para a rizosfera vão se multiplicar e se aderir irreversivelmente em sítios específicos encontrados na superfície das raízes. No próximo passo, os tricomas enrolam-se, envolvendo grupos de bactérias que, em seguida, degradam uma porção da parede celular do tricoma, levando à invaginação do plasmalema. As bactérias, então, invadem o tricoma, utilizando o canal formado pela invaginação do plasmalema, originando o cordão de infecção (Hungria et al., 1994; Morgante, 2003). A seguir, o cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando. A região do córtex da raiz, com intensa divisão celular, recebe o nome de nódulo primário. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção se ramifica para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias, contidas no interior de vesículas membranosas (simbiossomas), são liberados dentro do citoplasma das células vegetais do nódulo primário. A partir desse estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias, que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras, param de se multiplicar e passam por um processo de diferenciação onde aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se

transformarem em bactérias especializadas na fixação de N_2 , denominadas de bacteróides (Morgante, 2003; Jones et al., 2007).

3.3 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio está entre os principais elementos na constituição da matéria orgânica, sendo o quarto elemento mais abundante nas plantas e representando cerca de 8% a 16% de sua composição. O N é constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila, entre outros (Morgante, 2003). O nitrogênio (N) existe na natureza como nitrogênio molecular (N_2), íons de nitrato (NO_3), amônia (NH_3) ou incorporado em compostos orgânicos nitrogenados. Esse elemento participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como, produção de ácidos nucleicos e proteínas. Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de N_2 (79%), o N constitui um dos principais fatores limitantes à produção agrícola mundial, pois nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, devido à forte tripla ligação existente entre os dois átomos do N_2 (Hungria et al., 1994). O N necessário para a cultura pode ser obtido, principalmente, de três formas: diretamente do solo, através do uso de fertilizantes nitrogenados e pela fixação biológica de N_2 (FBN), realizada por rizóbios nativos ou naturalizados do solo, ou pelo uso de inoculantes contendo bactérias (rizóbios) capazes de realizar a FBN (Zakhia; de Lajudie, 2001).

O solo é uma fonte limitada desse nutriente, o qual se esgota após algumas culturas. Além de apresentarem um alto custo, os fertilizantes contribuem para a contaminação do meio ambiente através da sua lixiviação para lençóis freáticos. Outra desvantagem é que a produção do fertilizante requer grandes quantidades de petróleo como matéria-prima, uma fonte de energia não renovável e com valores sensíveis às variações cambiais do dólar. A FBN é um processo realizado por determinados procariontes, denominados organismos fixadores de N_2 . As bactérias capazes de fixar biologicamente o N_2 possuem uma enzima chamada dinitrogenase, que é formada por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2 , a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina, a qual, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína que, então, reduzida, doa o elétron recebido para a Mo-Fe-proteína, a qual acumula os elétrons até que ocorram oito transferências

concentrando oito elétrons, os quais são necessários para que a redução do N₂ à NH₃ ocorra (Morgante, 2003).

Estima-se que a fixação biológica do N₂ contribua com 65% da entrada anual de N na Terra, enquanto que a produção industrial de fertilizantes contribui com 24% e a fixação não-biológica, por raios e vulcanismo, com cerca de 10% (Hungria et al., 2001).

A associação do feijoeiro com bactérias denominadas, de um modo coletivo, como rizóbios, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à cultura, representa uma tecnologia capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios ao pequeno produtor. O inoculante brasileiro, durante muito tempo, foi produzido utilizando-se rizóbios das espécies *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, sendo que algumas destas bactérias eram obtidas no exterior e testadas pelas instituições de pesquisa no Brasil. Com a evolução dos estudos taxonômicos, revelando novos isolados com características simbióticas e adaptação ecológica distintas, inclusive envolvendo isolados obtidos das regiões de clima tropical, revelou-se uma nova perspectiva na utilização de inoculantes para as condições de cultivo do feijoeiro no Brasil. Atualmente, sabe-se que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli*, esta última representando a espécie dominante nos centros de diversidade genética do feijoeiro, estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética, ou seja, podem perder a capacidade de fixar nitrogênio no feijoeiro. A instabilidade genética leva a dificuldades no uso de tais estirpes como inoculantes, sendo responsável por respostas erráticas em relação ao uso pelos agricultores, e ao receio quanto à sua eficiência. Atualmente, como o resultado de diversos estudos, o inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil é produzido com uma espécie de rizóbio adaptada aos solos tropicais, *Rhizobium tropici*, resistente a temperaturas elevadas, acidez do solo e abrigando estirpes que podem ser altamente competitivas, ou seja, que, em condições de cultivo favoráveis conseguem predominar sobre a população de rizóbios presentes no solo, em geral pouco eficientes em fixar nitrogênio (Embrapa, 2011c).

Apesar do conceito geral de que o feijoeiro apresenta baixa capacidade de fixação de nitrogênio, os resultados de pesquisa, obtidos em condições de campo, indicam que é possível que a planta se beneficie da inoculação, atingindo níveis de produtividade de 2000 kg/ha ou superiores (por exemplo, Hungria et al., 2000,2003). Tendo em vista a alta diversidade procariótica presente no solo, o grande desafio consiste em identificar, classificar e verificar o potencial tecnológico de um número cada vez maior de microrganismos. Isso fica ainda mais evidente para microrganismos de importância agrícola ou ambiental, ainda pouco abordados em relação à área médica.

3.4 Taxonomia e Filogenia Bacteriana

A maneira como os microrganismos são diferenciados um dos outros vem mudando ao longo do tempo, devido às novas tecnologias que vão surgindo e tornando-se cada vez mais acessíveis aos pesquisadores. Em pleno século XVII, logo após a descoberta do microscópio, Anton Van Leeuwenhook utilizou-o pela primeira vez ao observar uma bactéria. Quase dois séculos depois (séc. XIX), com a técnica de ‘coloração de Gram’, as bactérias foram divididas em dois grupos, as Gram positivas e as Gram negativas e, logo após, já em meados do século XX, surgiram os métodos quimiotaxonômicos, fisiológicos e morfológicos (classificação fenotípica). Mas nada se compara à evolução tecnológica ocorrida na segunda metade do século XX, mais precisamente a partir dos anos 70, após a invenção da técnica de sequenciamento do DNA por Sanger. No mesmo período surgiram outras técnicas de grande importância, como a hibridização DNA-DNA e a reação em cadeia da Polimerase (PCR), além da automação do sequenciamento do DNA ocorrida logo após, em meados da década de 90, que representaram, sem dúvida, um grande salto para a biologia. Com as novas técnicas que estão surgindo, como é o caso do pirosequenciamento, a tendência é que o sequenciamento do DNA continue tendo um grande destaque e tornando-se cada vez mais notório, principalmente dentro da taxonomia (Klenk; Goker, 2010).

A ciência taxonômica começou a ser difundida a partir dos conhecimentos de Lineu no século 18 e vem sofrendo várias mudanças desde então. A definição atual segue como a descrita por Vandamme e colaboradores (1996), a —Taxonomia || pode ser usada como sinônimo de —Biosistemática || ou somente —Sistemática || e é dividida em: classificação (ordenar os organismos em seus respectivos grupos taxonômicos baseando-se na similaridade entre eles), identificação (posicionar os organismos desconhecidos em seus devidos grupos taxonômicos) e nomenclatura (nomear os grupos taxonômicos), além de informações filogenéticas e de genética populacional, que contribuem para uma completa definição da Biosistemática moderna.

Em um mundo dominado pelos computadores e pela internet, desde uma lista atualizada com o nome de todas as bactérias descritas até o momento, sequências de nucleotídeos e aminoácidos, até um arsenal de literatura científica, podem ser recuperados em poucos segundos a qualquer momento e em qualquer lugar do planeta. Apesar de alguns esforços, o grande entrave encontrado consiste na integração e sincronização desse grande volume de dados, já que a todo instante mais informações são geradas em todo o mundo,

acumulando com as já existentes. Com isso, o desenvolvimento de análises cada vez mais sofisticadas na área da computação, matemática e estatística, aliados aos conhecimentos microbiológicos, delineará o futuro da taxonomia (Gevers et al., 2006).

Atualmente a sistemática microbiana integra diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) para obter um consenso taxonômico na identificação e classificação dos microrganismos, sendo denominada de taxonomia polifásica (Vandamme et al., 1996). A metodologia de análise a ser utilizada vai depender do nível de resolução taxonômica que esta possui, ou seja, desde espécie e gênero, até níveis taxonômicos mais altos, dependendo de fatores como: número de estirpes da espécie em estudo, objetivo do estudo em questão e condições na aplicabilidade da técnica (Zakhia & Lajudie, 2001).

3.4.1 Características Fenotípicas

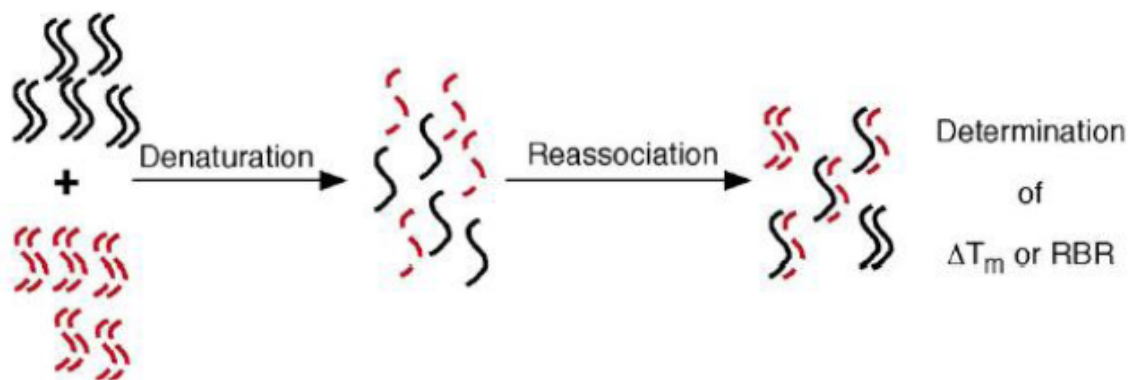
Os dados fenotípicos são extraídos das proteínas e suas funções, de marcadores quimiotaxonômicos e de outras características expressas. Os estudos fenotípicos incluem análises de morfologia como a forma, cor e dimensão das colônias, flagelos e coloração de Gram. As características fisiológicas e bioquímicas incluem a sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolissacarídeos, padrões enzimáticos (Multilocus Enzyme Electrophoresis), crescimento em diferentes pHs, temperaturas, concentrações de sais e na presença de antimicrobianos, além da avaliação da atividade de enzimas e testes de metabolização de carboidratos e aminoácidos encontrado em kits como o Microplate (Biolog) e API (Biomerieux) (Vandamme et al., 1996; Gillis et al., 2001). Todas essas investigações estão baseadas diretamente na utilização de culturas puras e na capacidade de cultivar esses microrganismos e analisar suas propriedades. Embora essas técnicas fenotípicas ainda sejam amplamente utilizadas na taxonomia, principalmente como meio de complementaridade, a principal desvantagem é que a informação potencial de um genoma procariótico nunca é totalmente expressada, porque a expressão gênica está diretamente relacionada às condições ambientais, ou às condições de laboratório, no caso de cultivo *in vitro*. Além de serem muito trabalhosas e despendem de muito tempo e habilidade, a reprodutibilidade das técnicas utilizadas nos estudos fenotípicos depende da sua padronização, tanto intra ou entre laboratórios, evitando avaliações subjetivas e aumentando a confiabilidade dos dados (Rossello-Mora et al., 2001).

3.4.2 Características Genotípicas

As informações genotípicas são obtidas a partir dos ácidos nucleicos, tanto do DNA como do RNA, e como exemplo podemos citar várias técnicas utilizadas para este fim, como por exemplo: porcentagem de G+C, hibridização DNA-DNA, padrões de restrição (RFLP, PFGE), sequenciamento de genes e genomas e PCR—fingerprinting ||, como exemplos o BOX, ERIC, RAPD e REP (Vandamme et al., 1996; Stackebrandt, 2002).

Desde a década de 1970, a definição de espécie, que é a unidade básica da taxonomia bacteriana, consiste em um grupo de estirpes, incluindo a estirpe padrão, que apresentam 70% ou mais de similaridade (taxa de ligação relativa) por hibridização DNA-DNA (HDD) e/ou 5°C, ou menos, nos valores de ΔT_m (Vandamme et al., 1996; Gevers et al., 2005). Na HDD, o DNA de dois organismos distintos é misturado e desnaturado. Em seguida, ocorre a reassociação (sob condições controladas) resultando em moléculas híbridas e quanto maior a similaridade genética entre os organismos, maior será a quantidade de híbridos e maior a energia necessária para separá-las. A comparação entre a mistura de DNAs e o DNA puro da estirpe de referência indica o grau de similaridade, ou a taxa de ligação relativa (do inglês, RBR). Já para o cálculo de ΔT_m , calcula-se a diferença do valor de T_m , ou temperatura de “melting” (temperatura em que 50% das fitas de DNA estão desnaturadas) entre o DNA puro e o DNA híbrido (Fig. 1) (Rossello-Mora et al., 2001). De acordo com os dados do “International Journal of Systematic Bacteriology” no ano de 1999, após a compilação de vários estudos, a ΔT_m de 4 a 5°C geralmente equivalem a similaridades maiores que 50% (Fig. 2)

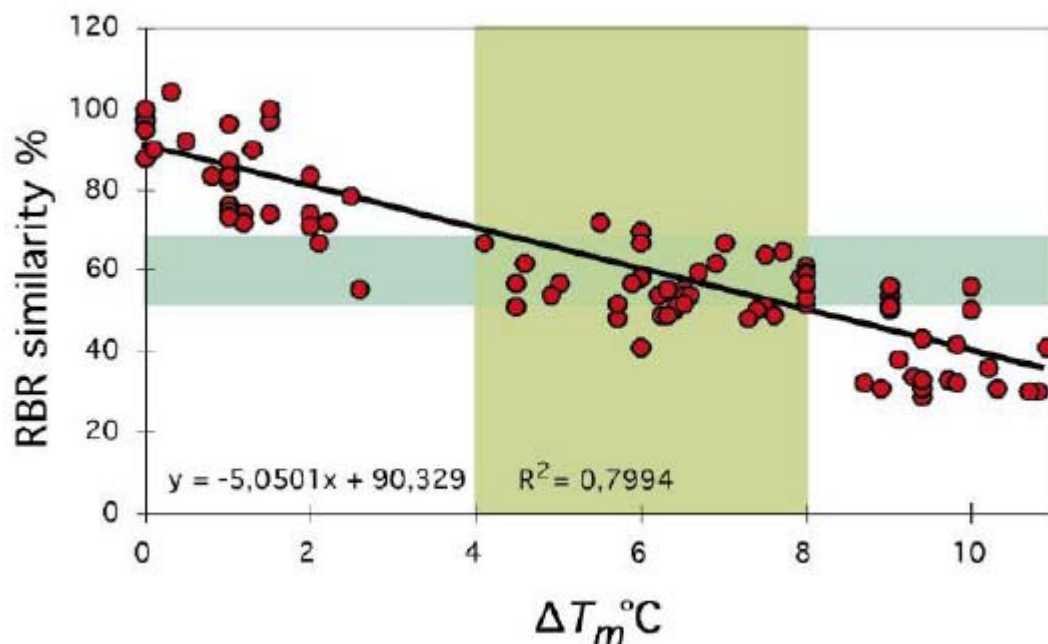
Figura 1 – Hibridização DNA-DNA.



Fonte: Rossello-Mora, 2001

Os dados de hibridização DNA-DNA e a ΔT_m obtidos ao longo do tempo, nas análises taxonômicas, são consistentes com os resultados obtidos mais recentemente, de sequenciamentos completos de genomas e de dados de filogenia molecular com base no gene ribossomal 16S e de outros genes conservados (Gevers, 2005). Embora a hibridização DNA-DNA seja considerada uma técnica padrão amplamente utilizada no delineamento de espécies na taxonomia bacteriana, algumas desvantagens devem ser destacadas, como o alto tempo consumido e a laboriosidade da técnica, além da dificuldade em construir um banco de dados comparativo entre os resultados de HDD obtidos entre diferentes estudos. Além disso, as metodologias utilizadas em diferentes laboratórios apresentam variações na determinação dos valores de hibridização, fazendo com que os resultados não sejam reproduzíveis de um laboratório para outro (Gevers et al., 2005; Vandamme et al., 1996; Klenk; Goker, 2010).

Figura 2 – Relação entre similaridade por hibridização DNA-DNA (RBR) e ΔT_m .



Fonte: Rosselló-Mora, 2001

3.4.3 Características Filogenéticas

No campo da filogenia, Zuckerkandl e Pauling (1965) propuseram a utilização da estrutura primária de moléculas biológicas como meio de correlacionar os organismos com sua história evolutiva. Anos depois, com o desenvolvimento das metodologias de sequenciamento molecular, as idéias iniciais de Zuckerkandl e Pauling se tornaram aplicáveis.

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

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

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

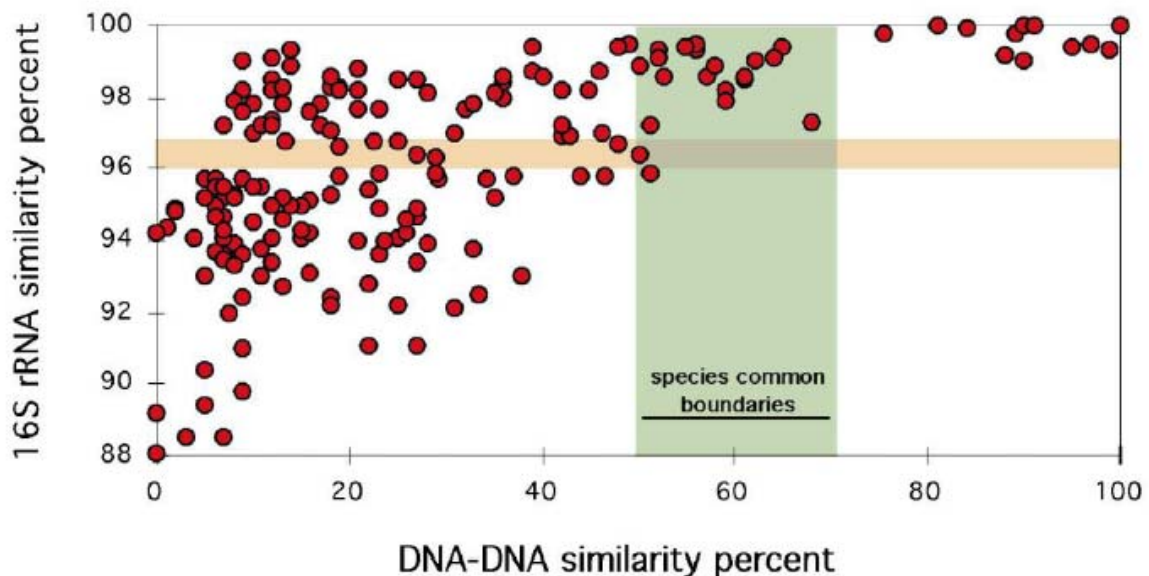
Com relação ao gene ribossomal 16S, o consenso atual é de que bactérias apresentando sequências com similaridades inferiores a 97% em relação à estirpe tipo da espécie podem indicar uma nova espécie e, a partir disso, microbiologistas podem identificar rapidamente isolados procarióticos através da comparação de suas sequências do gene ribossomal 16S com as sequências que já se encontram disponíveis nos bancos de dados (Gevers et al., 2005). O valor de 3% utilizado como linha de corte para identificar uma nova espécie através do gene ribossomal 16S foi calibrado a partir de estudos comparativos de hibridização DNA-DNA, e esse último foi medido a partir de estudos fenotípicos realizados anteriormente. Os dados mostraram que estirpes que geralmente apresentavam hibridização DNA-DNA de 70% ou mais, geralmente apresentavam 97% ou mais de similaridade (Gevers et al., 2006; Rosseló-Mora et al., 2001).

Embora a filogenia bacteriana esteja baseada na análise do gene ribossomal 16S, atualmente vários estudos têm demonstrado que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrer transferência horizontal de genes (THG), duplicação gênica e

recombinação genética resultando em seqüências mosaicas (Sullivan et al., 1996; van Berkum et al., 2003; Vinuesa et al., 2005; Gevers et al., 2005; Martens et al., 2007). Embora alguns pesquisadores destaquem o impacto da THG nos estudos taxonômicos, atualmente é aceito que a THG seja a principal força na evolução dos genomas, causando uma rápida aquisição de novos caminhos metabólicos. De acordo com um estudo realizado por Dagan e colaboradores (2008), ao menos 80% de todos os genes foram acometidos por uma THG ao longo da história. Uma evidência disso está no trabalho de Martens et al. (2007), onde foram encontradas algumas incongruências nas árvores construídas para alguns genes, quando comparadas com a árvore obtida com o gene ribossomal 16S, e isso pode indicar um evento de recombinação ou THG. Estas observações implicam que a análise filogenética bacteriana com base exclusivamente no gene ribossomal 16S pode nem sempre refletir a posição filogenética real dos procariotos.

Outra desvantagem do uso exclusivo do gene 16S nos estudos de taxonomia e filogenia é quando se estuda espécies muito relacionadas, que pelo fato destas apresentarem um alto nível de conservação nas seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S as divergências evolutivas ocorridas podem não ser identificadas e, conseqüentemente, as estirpes podem não ser diferenciadas (Stackebrandt et al., 2002). Sendo assim, enquanto isolados pertencentes a espécies distintas apresentam menos que 97% de similaridade na seqüência do gene ribossomal 16S e, normalmente, valores de HDD inferiores a 70%, alguns isolados que possuem similaridade $\geq 97\%$ com base no gene ribossomal 16S, podem também apresentar valores de HDD inferiores a 70% e, portanto, não pertencem à mesma espécie, como observado em alguns estudos com bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* (Fig. 3) (Jaspers; Overmann, 2004; Gevers et al., 2005). A partir dessas observações, foi proposto o termo microdiversidade, para descrever o fenômeno em que bactérias de diferentes populações, mas com o gene ribossomal 16S idêntico, possuem propriedades ecofisiológicas diferentes (Gevers et al., 2005; Jaspers; Overmann, 2004).

Figura 3 – Comparação de similaridades entre o gene ribossomal 16S e a hibridização DNA-DNA



Fonte: Rosselló-Mora, 2001

Devido às desvantagens do uso exclusivo do gene ribossomal 16S discutidas no item anterior, no início desta década foi proposta uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana, que consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci), os quais apresentem uma taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais, mas com um nível de conservação suficiente para conter informações evolutivas (Gevers et al., 2005; Martens et al., 2007; Stackebrandt et al., 2002). Desta forma, a análise concatenada de múltiplos genes poderia funcionar como um tampão || contra efeitos de recombinação ou transferência lateral ocorridos em um único gene específico.

Assim, com base nesta estratégia foi desenvolvida e implementada, para muitos grupos bacterianos, principalmente em bactérias de interesse epidemiológico, a metodologia de Multilocus Sequence Typing || (MLST). O MLST consiste no sequenciamento e análise conjunta (como uma única sequência concatenada) de no mínimo cinco genes housekeeping” (Stackebrandt et al., 2002) e, atualmente, é mais utilizado na epidemiologia molecular para discriminação em níveis infra-específicos, ou seja, na diferenciação de estirpes da mesma espécie. A análise é realizada a partir da similaridade entre as sequências nucleotídicas, onde as diferenças encontradas no pareamento de nucleotídeos caracterizam diferentes alelos e, a partir disso, é possível diferenciar clones dentro de um grupo de estirpes estudado (Gevers et al., 2005). De acordo com Zeigler (2003) e Thompson et al. (2005), esses genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos,

além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios como: *i)* estarem no genoma em uma única cópia; *ii)* terem extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento e contenham informações suficientes para as análises; *iii)* encontrar-se amplamente distribuídos pelo genoma, de maneira que fiquem submetidos a diferentes pressões seletivas *iv)* que os dados obtidos com o uso destes genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA.

A fim de ser aplicada na taxonomia bacteriana para a definição de espécies e elucidação das relações taxonômicas entre espécies, foi proposta a metodologia de Multilocus Sequence Analysis || (MLSA), baseada na técnica de MLST (Gevers et al, 2005; Martens et al., 2007). O MLSA utiliza um grupo mais diversificado de estirpes como, por exemplo, um gênero inteiro, e faz o uso de genes que não sejam, necessariamente, housekeeping ||, mas que estejam presentes em todos os organismos em análise, e que cumpram os mesmos requisitos do MLST. Na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, sendo utilizados procedimentos de análise filogenética, ou seja, algoritmos programados para calcular a taxa evolutiva com base na seqüência de nucleotídeos de genes (alelos) que estejam presentes em todas as linhagens do táxon em estudo (gênero ou família), enquanto o MLST está focado apenas no grau de similaridade entre as seqüências (Gevers et al., 2005). Tendo isso como base e, devido ao alto poder de resolução, o MLSA tem permitido a discriminação de estirpes em nível de espécie, onde inicialmente os organismos são identificados em nível de gênero ou família com base no gene ribossomal 16S (Gevers et al., 2005; Martens et al., 2008).

A metodologia de MLSA já foi aplicada, nos últimos anos, em estudos taxonômicos com diferentes gêneros bacterianos, como *Bulkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Ensifer*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Gevers et al., 2005; Thompson et al., 2005; Martens et al., 2007; Martens et al., 2008; Ribeiro et al., 2009).

Estudos filogenéticos realizados recentemente, dentro de diversos grupos bacterianos, bem como dentro do grupo dos rizóbios, utilizaram genes marcadores filogenéticos alternativos, como: *atpD* e *recA* (Gaunt et al., 2001), *glnA* e *glnB* (Wernegreen & Riley, 1999; Turner; Young, 2000; Martens et al., 2007), *dnaK* (Stepkowski et al, 2003), *thrC* e *gltA* (Hernández-Lucas et al.,2004; Martens et al., 2007). No entanto, a filogenia obtida com base nestes marcadores isolados, nem sempre foi congruente com a filogenia obtida com

base no gene ribossomal 16S, o que pode ter ocorrido por eventos de transferência lateral de genes ou mesmo por possuírem uma taxa evolutiva maior (Martens et al., 2007).

Atualmente, com a popularização e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática cada vez mais sofisticadas, novos métodos de análises têm sido desenvolvidos, a fim de melhorar as análises das relações filogenéticas existentes entre os microrganismos e, com isso, pode-se aproximar, cada vez mais, da história evolutiva entre eles (Coenye et al., 2005; Delsuc et al., 2005; Snel et al., 2005). Embora as sequências dos genes ribossomais 16S e a hibridização DNA-DNA continuem sendo consideradas como critérios moleculares para o delineamento de espécies, espera-se que muitas informações taxonômicas adicionais possam ser obtidas a partir de sequências genômicas completas (Coenye et al., 2005). O conteúdo e ordem gênica, a análise comparativa de sequências de macromoléculas conservadas, a análise de presença e ausência de genes, a composição de nucleotídeos, bem como a distância filogenética com base no BLAST genômico, são alguns exemplos de métodos recentes baseados na genômica e que podem ser utilizados na taxonomia. Além da genômica tradicional, a metagenômica vem demonstrando que também pode auxiliar em estudos taxonômicos principalmente no que diz respeito a bactérias não cultiváveis, que até pouco tempo não eram muito exploradas, mas que recentemente demonstraram que possuem uma grande importância dentro da sistemática de procariotos, já que muitos autores estimam que apenas 1% dos microrganismos são cultiváveis. Embora esteja ocupando um lugar de destaque, o grande desafio das pesquisas em metagenômica, no campo da taxonomia, consiste em como extrair dados taxonômicos compreensíveis de amostras de comunidades complexas e, a partir disso, realizar análises qualitativas e quantitativas, comparando amostras de diferentes localidades e diferentes condições (Gevers et al. 2006).

Levando em conta que o principal foco da taxonomia é entender o que representa uma espécie procariótica e cada vez mais melhorar os métodos utilizados no delineamento dessas unidades taxonômicas, é necessário entender como os sistemas procarióticos emergem, se separam e se mantêm como entidades distintas ao longo do tempo. Sendo assim, o grande número de microrganismos que ainda existem para serem identificados e classificados, e o notável avanço das técnicas de biologia molecular, as quais têm gerado uma quantidade consideravelmente grande de dados e permitido um refinamento nas análises taxonômicas, a moderna biosistemática tem adquirido cada vez mais importância dentro da microbiologia, já que a biodiversidade está estritamente ligada à taxonomia.

3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA DOS RIZÓBIOS

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

Já no início do século 20, os rizóbios foram classificados taxonomicamente, baseados em características fenotípicas, principalmente na capacidade de nodular algumas leguminosas, e com base neste conceito, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas inicialmente por Fred et al. (1932), como *Rhizobium phaseoli*. Ao mesmo tempo em que as espécies eram divididas fenotipicamente, surgiu o gênero *Agrobacterium* que ao invés de nodular como as espécies do gênero *Rhizobium*, elas tinham como principal característica causar patologias em plantas (Cohn, 1942). Porém, essa concepção foi modificada, devido à observação de reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, onde uma única leguminosa poderia abrigar diferentes bactérias simbiontes, como por exemplo, o feijoeiro, que na classificação atual possui sete espécies distintas nodulando suas raízes (Terefework et al., 2000; Rivas et al., 2009).

O período seguinte, já na década de 60, foi marcado pelo aprimoramento na classificação das espécies de rizóbios utilizando as análises de características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (Jordan 1984). Com base nesse novo conceito, Graham (1964) dividiu as bactérias de crescimento lento e rápido em meio de cultura específico, onde as que possuíam crescimento lento, e que inicialmente eram denominadas de *Rhizobium japonicum*, foram classificadas posteriormente como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), enquanto as bactérias de crescimento rápido como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Também com base nos estudos fenotípicos, o gênero *Agrobacterium* foi dividido em quatro espécies: *A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes* e *A. radiobacter*. Logo em seguida, outros quatro gêneros foram incluídos na família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) e *Allorhizobium* (de Lajudie et al., 1998), que atualmente deixou de ser um gênero a parte e voltou a pertencer ao gênero *Rhizobium* (Rivas et al., 2009).

Atualmente, embora constitua um gênero a parte, o *Agrobacterium* ainda possui uma classificação confusa dentro dos rizóbios, pois sua posição filogenética com base em alguns genes “housekeeping” e no gene ribossomal 16S, encontra-se muito próxima ao

gênero *Rhizobium* e por isso serão precisos estudos futuros para a sua correta classificação taxonômica (Farrand et al., 2003; Ribeiro et al., 2009). Enquanto o gênero *Rhizobium* apresenta atualmente 33 espécies descritas (Rivas et al., 2009), o gênero *Bradyrhizobium* possui oito espécies descritas: *B. jicamae*, *B. pachyrhizi*, *B. yuanmingense*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. betae*, *B. canariense* e *B. japonicum*, o qual está presente em inoculantes industriais para utilização em soja (*Glycine max*) em várias partes do mundo (Willens, 2006; Rivas et al., 2009).

Em 1988, Chen e colaboradores propuseram o novo gênero *Sinorhizobium*, contendo a espécie *R. fredii*, que a partir de então passaria a ser denominada como *S. fredii*, além da espécie *R. meliloti*, renomeada como *S. meliloti*. Esses mesmos autores propuseram uma segunda espécie para este gênero que foi chamada de *S. xinjiangense*. Por possuírem crescimento rápido, assim como as bactérias do gênero *Rhizobium*, este novo gênero não foi aceito prontamente. Apenas em 1994, a partir de dados filogenéticos como suporte, *Sinorhizobium* foi aceito como um novo gênero, embora alguns autores tenham proposto a união de todas as espécies de *Sinorhizobium* junto com a espécie *Ensifer adhaerens* dentro de um único gênero, *Ensifer* (Martens et al., 2007; Young et al., 2003). Atualmente o gênero *Ensifer* apresenta 12 espécies: *E. americanus*, *E. arboris*, *E. fredii*, *E. kostiense*, *E. kummerowiae*, *E. meliloti*, *E. medicae*, *E. morelense*, *E. sahelii*, *E. teranga*, *E. xinjiangense* e *E. adhaerens* (Rivas et al., 2009).

Compreendendo uma faixa intermediária na velocidade de crescimento, e nodulando uma diversidade de leguminosas, estão as bactérias do gênero *Mesorhizobium*, com 19 espécies descritas: *M. albiziae*, *M. australianum*, *M. caranganae*, *M. gobiense*, *M. metallidurans*, *M. oportunistum*, *M. shangrilense*, *M. tarimense*, *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* e *M. thiogangeticum* (Willens, 2006; Rivas et al. 2009).

Desse modo, a classificação atual dos rizóbios e outras bactérias capazes de estabelecer simbiose, são definidas como: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alphaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; com a distribuição nas famílias *Bradyrhizobiaceae*, *Hiphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* e *Rhizobiaceae* (Garrity; Holt, 2001, NCBI, 2011). A classe *Alphaproteobacteria* é dividida em dez gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, classificados através da análise do gene ribossomal 16S, sendo observada uma maior relação entre os três últimos gêneros, onde inclusive, já foi proposto anteriormente que o gênero *Sinorhizobium*

seria um subclado dentro do gênero *Rhizobium*, devido a uma íntima ligação entre eles, entretanto, quanto mais sequências são incluídas para o estudo, mais as espécies de *Sinorhizobium* se apresentam como um grupo monofilético (Lloret & Esperança, 2005). Em relação às bactérias da classe *Betaproteobacteria*, tem-se a ordem *Burkholderiales* e a família *Burkholderiaceae* para os gêneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* (= *Wautersia*, = *Ralstonia*) (NCBI, 2011). A Figura 4 apresenta a filogenia dos rizóbios com base no gene ribossomal 16S e de outras bactérias da classe *Alphaproteobacteria*.

Apesar de a taxonomia atual ser baseada no gene ribossomal 16S, um estudo recente realizado por Martens et al. (2007) demonstrou que a técnica de MLSA, utilizando cinco genes —housekeeping || foi mais apropriada para a classificação de bactérias do gênero *Ensifer*, quando comparada à filogenia com base apenas no gene ribossomal 16S. Nesse estudo foram utilizados os seguintes genes nas análises filogenéticas: *dnaK* (heat shock protein) (Stepkowski et al., 2003), *glnA* (glutamina sintetase) (Wernegreen & Riley, 1999; Turner; Young, 2000), *gltA* (citrate syntase) (Hernández-Lucas et al., 2004), *recA* (recombinase A) (Gaut et al., 2001) e *thrC* (threonine syntetase). No ano seguinte, o mesmo grupo (Martens et al., 2008) utilizou mais cinco genes em outro trabalho: *atpD* (ATP sintase), *gap* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *rpoB* (subunidade beta da RNA Polimerase), *pnp* (polyribonucleotídeo nucleotidiltransferase), *gyrB* (subunidade beta da DNA girase) e afirmou, após análises comparativas, que o MLSA, assim com a hibridização DNA-DNA, são metodologias adequadas para a delimitação e avaliação das relações procarióticas em nível de espécies.

Em outros trabalhos com rizóbios, Ribeiro et al., (2009) utilizaram os genes: *dnaK*, *gltA* e *recA* além de *glnII* (glutamina sintetase II) e *rpoA* (subunidade alfa da RNA Polimerase) e Menna et al., (2009) que além dos genes housekeeping também utilizou o gene ITS (Espaço Interno Transcrito) . Todos esses estudos recentes fornecem suporte para estudos futuros tanto em rizóbios quanto em outros grupos bacterianos, seguindo uma tendência na utilização da técnica de MLSA para a filogenia e taxonomia em procariotos.

3.6 TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS QUE NODULAM O FEIJOEIRO

Na classificação realizada por Fred et al. em 1932, baseada no princípio do grupo de inoculação cruzada, as bactérias que nodulavam o feijoeiro foram classificadas como *Rhizobium phaseoli*. Após 50 anos, com o aprimoramento da taxonomia e a classificação baseada em características genéticas, bioquímicas e fisiológicas surgiu a espécie *R.*

leguminosarum, sendo esta ainda subdividida em três biovares, de acordo com a planta hospedeira: *R. leguminosarum* bv.viciae, que nodula a ervilha, ervilhaca e fava (*Pisum sativum*, *Vicia sativa*, *V. fava*), *R. leguminosarum* bv trifolii, que nodula os trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv phaseoli, que nodula o feijoeiro.

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

Em 1991, Martinez-Romero et al. definiram as estirpes do grupo II como uma nova espécie, que foi denominada de *R. tropici*. Este estudo envolveu a análise parcial do gene ribossomal 16S e a hibridização DNA-DNA, onde foi encontrada baixa homologia (36%), além de outras diferenças, tanto genotípicas como fenotípicas, entre as estirpes deste grupo. Devido a essas diferenças, as bactérias dessa nova espécie foram divididas em dois tipos, IIA e IIB, com as estirpes CFN 299 e CIAT 899, respectivamente, determinadas como estirpe de referência para cada um desses tipos, enquanto que a CIAT 899 foi definida como a estirpe tipo (—type strain ||). O trabalho realizado por Ribeiro et al., (2009) também encontrou diferença considerável entre essas duas estirpes de *R. tropici* através da metodologia de MLSA, corroborando os dados anteriores e propondo mais estudos para uma possível reclassificação dessas estirpes. Essa espécie é bem adaptada a solos ácidos e submetidos a altas temperaturas e, também, tem sido encontrada em outros continentes, como na Europa (Amarger et al., 1994; Herrera-Cervera et al., 1999) e na África (Anyango et al., 1995).

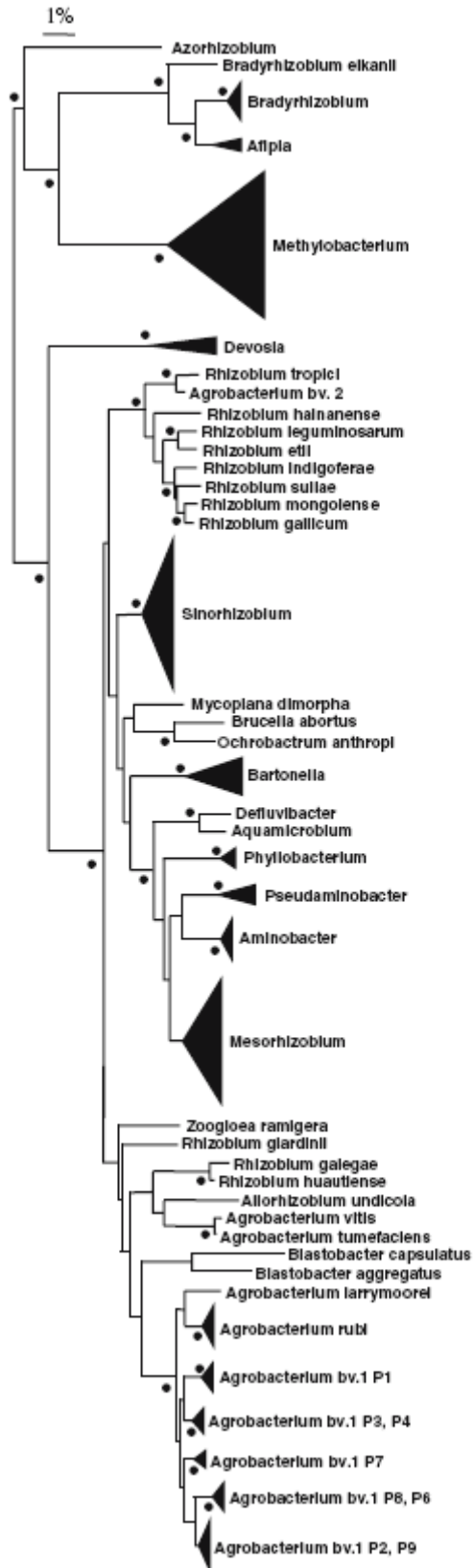
Dois anos depois, Segovia et al. (1993), através de análise da sequência de nucleotídeos do gene ribossomal 16S, sugeriram que alguns rizóbios isolados de solos americanos (América Central e centros Andinos) e inicialmente classificados como pertencentes ao tipo I, fossem reclassificados em uma nova espécie, *Rhizobium etli*, a qual possui a estirpe CFN 42 como estirpe tipo. Esta nova espécie, juntamente com a espécie de *R. leguminosarum*, inclui as bactérias originalmente classificadas no grupo I, que possuem uma alta correlação, tanto para algumas regiões cromossômicas, quanto para genes contidos no plasmídeo simbiótico, que são homólogos e organizados similarmente (Vasquez et al., 1993), indicando a possibilidade de ter ocorrido uma transferência do plasmídeo simbiótico de *R. etli*

para *R. leguminosarum*, quando os primeiros foram introduzidos na Europa (Segovia et al., 1993). Amarger et al. (1997), posteriormente, sugeriram a ocorrência da transferência do plasmídeo simbiótico de *R. leguminosarum* bv. phaseoli para *R. gallicum* bv. phaseoli e *R. giardinii* bv. phaseoli (Amarger et al., 1997).

Atualmente, dentro do grupo dos rizóbios que nodulam o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) estão descritas as seguintes espécies: *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. giardinii*, *R. gallicum* (Amarger et al., 1997), *R. lusitanum* (Valverde et al., 2006) e *R. multihospitium* (Han et al., 2008).

Devido ao rápido avanço da taxonomia moderna e à grande biodiversidade encontrada nos solos, não apenas do Brasil como em todo o mundo, a tendência é que novas espécies bacterianas sejam descritas e, conseqüentemente, aumentem as chances de descoberta de estirpes cada vez mais adaptadas e eficientes que possam ser utilizadas em inoculantes, resultando em incremento de produtividade. A posição taxonômica e as relações filogenéticas dessas novas estirpes, porém, precisam ser estudadas e determinadas.

Figura 4 – Filogenia de rizóbios (classe Alphaproteobacteria) com base na sequência do gene ribossomal 16S



Fonte: Willens et al., 2006

3.7 DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE BACTERIANA

De acordo com o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP), no delineamento de uma nova espécie bacteriana algumas regras padronizadas devem ser seguidas, a fim de garantir a qualidade dos resultados, fazendo com que o novo táxon seja alocado o mais próximo possível da sua posição taxonômica natural dentro de um grupo procariótico. Além disso, os dados devem demonstrar coerência genotípica, fenotípica e filogenética entre os membros da nova espécie e, por outro lado, os mesmos devem ser discriminantes quando comparados com os elementos das espécies mais relacionadas. Conseqüentemente, o artigo para a submissão de uma nova espécie bacteriana deve conter as seguintes exigências:

- Para qualquer espécie, uma estirpe tipo („type strain“) deve ser nomeada. Esta estirpe deve estar depositada em pelo menos duas coleções de culturas em diferentes países, além de ser completamente estudada por abordagem polifásicas, incluindo análises genéticas, fenotípicas e filogenéticas;
- É altamente recomendável que sejam utilizadas ao menos três estirpes para a descrição de uma nova espécie e que as mesmas sejam igualmente estudadas de modo a descrever a diversidade intra-específica;
- A análise de hibridização DNA-DNA deve ser realizada entre a estirpe tipo e as outras estirpes do mesmo grupo, além das estirpes tipo pertencentes aos táxons mais próximos. Para a delimitação de uma nova espécie, os valores de similaridade devem estar de acordo com as exigências descritas anteriormente (ver revisão bibliográfica);
- Estudos genéticos como perfis de „fingerprinting“ devem ser realizados (ERIC, REP, BOX, RAPD). Além disso, a sequência do gene ribossomal 16S (> 1300 pb) da estirpe tipo deve ser depositada em um banco de dados público (DDBJ/ EMBL/ GenBank). O número de acesso deve ser apresentado;
- Para seqüências de outros genes (MLSA), todos os números de acesso gerados devem ser publicados;
- É altamente recomendável o estudo de marcadores quimiotaxonômicos como: perfis de ácidos graxos, composição de lipídios polares, quinonas e padrões de Poliaminas,
- É obrigatório definir o conteúdo de GC (%) das estirpes do novo táxon.

Todos esses critérios foram obtidos em instruções para o autor da revista „Systematic and Applied Microbiology“ (2011). É importante destacar que toda nova

espécie descrita, para ser validada, precisa ser publicada no “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” ou na “Systematic and Applied Microbiology”.

REFERÊNCIA

- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rizhobium tropici* nodulates fiel-grow *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, v.161, p.147-156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaesolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 996–1006, 1997.
- ARAUJO, R. S. **Fixação biológica do nitrogênio em feijão**. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p.91-120, 1994.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4016-4021, 1995.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, S.; D'AVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium spp.* strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.54, p.1280-1283, 1988.
- CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392–397, 1988.
- COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.147-167, 2005.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Feijão total (1º, 2ª e 3ª safra) – Brasil – Série histórica. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/download/safra/FeijaoTotalSerieHist.xls>>, acesso em 10 de Março de 2011.
- CONN, H. J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v.44, p.353–360, 1942.
- DAGAN, T.; ARTZY-RANDRUP, Y.; MARTIN, W. Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.10039-10044, 2008.
- DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; PHILIPPE, H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.361-375, 2005.
- DROZDOWICZ, A. Bacterias do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., (Eds.), **Biologia dos solos do cerrados**. EMBRAPA, Planaltina, p.17-67, 1997.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.89-98, 1988.

- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2011 a). **Agência de informação – feijão**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_62_1311200215103.html>, acesso em 10 de Março de 2011.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2011 b). Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>>, acesso em 10 de Março de 2011.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2011 c). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbnl_inocula_feijoeiro.html>, acesso em 10 de Março de 2011.
- FARRAND, S. K.; VAN BERKUM, P. B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable member of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.53, p.1681–1687, 2003.
- FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Journal of the American Botanical Society*, 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**, p.343, 1932.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed., v.1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria 2nd ed. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, p.119-154, 2001.
- GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2037-2048, 2001.
- GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus (Fabaceae)* beans. **Economic Botany**, v.44, p.28–38, 1990.
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.
- GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANDAMME, P.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE VOS, P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.361, p.1911-1916, 2006.
- GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal Systematic of Bacteriology**, v.45, p.274-289, 1995.
- GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, v.35, p.511–517, 1964.

- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.
- HAN, T. X.; WANG, E. T.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; GU, J. G.; GU, C. T.; TIAN, C. F.; CHEN, W. X. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v.58, p.1693-1699, 2008.
- 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.
- 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.
- HERRERA-CERVERA, J. A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H. V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.87-97, 1999.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001 48 p. (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, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, p.189-295, 1997.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., (Eds) *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, v.2, p.9-89, 1994.
- JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.
- JASPERS E.; OVERMANN, J. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.4831-4839, 2004.
- JORDAN, D. C.; Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore, p.235-244, 1984.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* models. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.619-633, 2007.

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

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

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

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

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.32, p.210-220, 2005 b.

KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.175–182, 2010.

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

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

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.

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.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417–426, 1991.

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

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite

rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

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.

MORGANTE, P. G., 2003. **Fixação Biológica e Assimilação de Nitrogênio**. acesso em 04/12/2010. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm>>

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=147700&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>, acesso em 10 de Março de 2011.

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

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* 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**, 2, 51-69, 2009.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

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

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

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

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The Variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.483-494, 2003.

- SULLIVAN, J. T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2818–2825, 1996.
- TEREFEWOR, Z.; LORTET, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTRÖM, K. **Molecular evolution of interactions between rhizobia and their Legume hosts**. 187-206, cap 13. In: Prokaryotic Nitrogen Fixation A Model System for Analysis of a Biological Process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2000.
- TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to order rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.349-356, 1998.
- THOMPSON, F. L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and Molecular Identification of *Vibriosis* 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.
- VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.
- VAN BERKUM, P., TEREFEWOR, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM M. 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.
- VASQUEZ, M.; DAVALOS, A.; DE LAS PENAS, A.; SANCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.1250-1258, 1991.
- VELASQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in las, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v.72, p.373-382, 1992.
- VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.702–716, 2005.
- WERNEGREEN, J. J.; RILEY, M. A. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.98-113, 1999.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p.3-14, 2006.

WOESE, C. R.; GEORGE, E. F. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.74, p.5088-5090, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, p.4576-4579, 1990.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an amended 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. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.2107–2110, 2003.

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 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 ESTUDO 1

RECLASSIFICATION OF *RHIZOBIUM TROPICI* TYPE A STRAINS AS *RHIZOBIUM LEUCAENAE* SP. NOV.

Renan Augusto Ribeiro,^{1,2,δ} Marco A. Rogel,^{3 δ} Aline López-López,³ Ernesto Ormeño-Orrillo,¹ Fernando Gomes Barcellos,⁴ Julio Martínez,³ Fabiano Lopes Thompson,⁵ Esperanza Martínez-Romero,³ Mariangela Hungria¹

Author for correspondence:

Ernesto Ormeño-Orrillo

E-mail: eormeno.orrillo@gmail.com

Telephone: (+55) 43-33716206

Fax: (+55) 43-33716100

Running title: *Rhizobium leucaenae* sp. nov.

Abbreviations: rep-PCR: repetitive extragenic palindromic PCR; ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis; FAME: Fatty Acid Methyl Ester.

Subject category: New Taxa (subsection Proteobacteria).

The GenBank accession numbers for the 49 new sequences reported in this paper are provided in Supplementary Table S1.

¹ Embrapa Soja, Cx. Postal 231, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil

² Universidade Estadual de Londrina, Dept. of Microbiology, Cx. Postal 60001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil

^δ These authors contributed equally to his work

³ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

⁴ Universidade Paranaense – UNIPAR, Cx. Postal 224, 87502-210, Umuarama, Paraná, Brazil

⁵ UFRJ, Center of Health Sciences, Institute of Biology, Cx. Postal 68011, 21944-970, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Summary

Rhizobium tropici is a well-studied legume symbiont characterized by high genetic stability of the symbiotic plasmid and tolerance to tropical environmental stresses such as high temperature and low soil pH. However, high phenetic and genetic variabilities among *R. tropici* strains have been largely reported, with two subgroups, designated type A and B, already defined within the species. A polyphasic study comprising multilocus sequence analysis, phenotypic and genotypic characterizations, including DNA-DNA hybridization, strongly supported the reclassification of *R. tropici* type A strains as a new species, for which the name *Rhizobium leucaenae* sp. nov. is proposed. *R. leucaenae* and *R. tropici* grouped with *R. multihospitium*, *R. miluonense*, *R. lusitanum* and *R. rhizogenes* in the phylogenies of the 16S rRNA, *recA*, *gltA*, *rpoA*, *glnII* and *rpoB* genes constituting a group of closely related species. Several phenotypic features, including the use of specific carbohydrate sources and tolerance to antibiotics and fungicides are provided as new characteristics differentiating the novel species from *R. tropici*. Several phenotypic traits differentiating *R. leucaenae* from all related species are also presented. *R. leucaenae* is a broad host range rhizobia being able to establish effective root-nodule symbioses with *Leucaena leucocephala*, *L. esculenta*, common beans (*Phaseolus vulgaris*) and *Gliricidia sepium*. CFN 299^T (=USDA 9039^T =LMG 9517^T =CECT 4844^T =JCM 21088^T =IAM 14230^T =SEMIA 4083^T =CENA 183^T =UMR1026^T =CNPS0 141^T) is designated as the type strain.

Introduction

A variety of bacterial species, collectively known as rhizobia, can induce the formation of specific structures, the nodules, on the roots of legumes eliciting a symbiotic process in which the rhizobia fix atmospheric nitrogen and supply it to the plant. Interest in the use of rhizobia as biofertilizers in agriculture has promoted studies on their diversity and the description of a large number of rhizobial species.

Rhizobium tropici is a broad host range rhizobia. It has been isolated from *Leucaena* spp. nodules in Brazil (Hungria *et al.*, 2000; Martínez-Romero *et al.*, 1991), and from *Gliricidia sepium* (Acosta-Durán; Martínez-Romero, 2002) and *Acaciella angustissima* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009) in Mexico. The species has also been isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules in several countries (Amarger *et al.*, 1994; Anyango *et al.*, 1995; Diouf *et al.*, 2000; Grange; Hungria, 2004; Pinto *et al.*, 2007). It has been argued that beans are not natural hosts for *R. tropici* because the presence of this species in bean nodules is positively correlated with low soil acidity (Amarger *et al.*, 1994; Anyango *et al.*, 1995) while in the neutral soils at the centers of origin of beans, *R. etli* is the predominant nodule occupant (Acosta-Durán; Martínez-Romero, 2002; Grange *et al.*, 2007). Nevertheless, *R. tropici* has been used as an efficient inoculant for beans in the tropics, due to its high

tolerance to environmentally stressful conditions and its high genetic stability (Hungria *et al.*, 2003; Hungria *et al.*, 2000).

R. tropici, reported in 1991 (Martínez-Romero *et al.*, 1991), was the first description of a new rhizobial species to include 16S rRNA gene-sequence analysis as a species characteristic. Less was known then on rhizobial species identification using molecular markers, and few rhizobial species had been described. At that time, in spite of evidence that supported the proposal of two species from the nodule isolates analyzed, such as differences in 16S rRNA gene sequences and low DNA-DNA hybridization values, only one novel species was accepted. However, two types, A and B, were recognized to account for these differences. Other species are now recognized to be close relatives of *R. tropici*, such as *R. lusitanum* (Valverde *et al.*, 2006), *R. multihospitium* (Han *et al.*, 2008), *R. miluonense* (Gu *et al.*, 2008), and *R. rhizogenes* (Hernández-Lucas *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2010). Some of these species are either more closely related to type A or to type B strains in phylogenetic trees (Han *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 2010). Recently, it was recommended that species containing several distinct genotype clusters should be subdivided into multiple species, each corresponding to a single genotype cluster (Achtman; Wagner, 2008). In this study, we review reported differences between the two *R. tropici* groups and present new evidence to suggest that *R. tropici* type A strains belong to a new species different from *R. tropici*. Nodule isolates from two regions of Brazil, and from Mexico, are included in the description.

Methods

Strains, culture conditions and DNA extraction

The rhizobial strains used in this study are listed in Supplementary Table S2. Four Brazilian strains (BR 828, BR 10043, CPAO 29.8, 77) were chosen as representatives of a collection of dozens of strains identified as *R. tropici* type A in previous studies (Grange; Hungria, 2004; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Mercante *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2007). The well-studied CFN 299^T type A strain was also included. Three Mexican isolates (CCGE 521, CCGE 522, CCGE 523) were obtained from Zacatecas, the largest common-bean-growing area in Mexico, and have not been previously reported.

All strains were deposited at the —Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection || of Embrapa Soja (Londrina, Brazil), and at the

Center for Genomic Sciences Culture Collection (Cuernavaca, Mexico). Except where specified, strains were grown on yeast extract-mannitol (YM) broth (containing 5 g l⁻¹ of mannitol), in the dark, at 28 °C. Source cultures were maintained in YM-agar (YMA) at 4 °C. Stocks were prepared on YM and kept at -80 °C (in 30% glycerol) for long-term storage. Total genomic DNA of each strain was extracted as described before (Kaschuk *et al.*, 2006).

rep-PCR genomic fingerprinting

DNA amplification with BOX-A1R primer was performed as described by Pinto *et al.* (2007). The fingerprint was generated by electrophoresis of 25 µL of the PCR reactions on a 1.5% agarose gel and ethidium bromide staining. Gel images were analyzed with the Bionumerics program version 4.6 to generate Jaccard similarity coefficients that were clustered with the UPGMA algorithm.

Phylogenetic analyses

Besides the 16S rRNA gene phylogeny, a multilocus sequence analysis (MLSA) approach with five protein-coding genes was used. Fragments of *recA*, *gltA*, *rpoA*, *glnII* and *rpoB* were amplified and sequenced as described before (Ribeiro *et al.*, 2009; Rincón-Rosales *et al.*, 2009). All these genes have been previously used in studies of rhizobial diversity (Martens *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Multiple sequence alignments for each gene were performed with CLUSTAL_X version 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) and manually checked with BioEdit (Hall, 1999). Best-fit models of sequence evolution were selected for each gene, and for the concatenated set of five protein-coding genes with JModelTest 0.1.1, using the Akaike information criterion (Posada, 2008). Maximum likelihood (ML) phylogenies were constructed with PhyML 3 using subtree pruning and regrafting (SPR) moves to improve tree topology (Guindon *et al.*, 2010). Support for tree nodes was evaluated by the Shimodaira-Hasegawa (SH)-like approximate likelihood-ratio test (aLRT) implemented in PhyML.

DNA-DNA hybridizations

DNA relatedness was determined with a filter hybridization methodology as previously described (Martínez-Romero *et al.*, 1991) using ^{32}P -labelled DNA of the CFN 299^T strain as a probe.

Phenotypic tests

Morpho-physiological characterization of the strains included evaluation of colony morphology, acid/alkaline production in YMA, tolerance to various pHs and temperatures, growth in Luria-Bertani (LB) and peptone-yeast extract (PY) minus Ca media, as described before (Hungria *et al.*, 2000; Martínez-Romero *et al.*, 1991). Growth on selected carbon and nitrogen sources was evaluated as previously described (Martínez-Romero *et al.*, 1991). In addition, bacteria were evaluated for the capacity to utilize the forty-nine carbohydrates included in the API 50CH kit (BioMérieux) as specified by the manufacturer, using YM-minus-mannitol as the basal medium. Resistance to chloramphenicol ($50\ \mu\text{g L}^{-1}$) and kanamycin sulfate ($5\ \mu\text{g L}^{-1}$) in YMA, and to captan ($50\ \mu\text{g L}^{-1}$) and thiram ($25\ \mu\text{g L}^{-1}$) in PY agar plates was also evaluated. Captan and thiram are seed-dressing fungicides commonly use in agriculture and may influence the survival or seed-applied inoculants.

Results and Discussion

rep-PCR fingerprints

BOX-A1R PCR fingerprints revealed a group of four Brazilian and three Mexican strains that clustered with CFN 299^T, the reference type A strain. This cluster was clearly separated from *R. tropici* type B (Suppl. Fig. S1) as well as from other rhizobial type or reference strains (data not shown). In a previous study, Brazilian type A strains CFN 299^T, CPAO 29.8 and 77 were also clustered separately from *R. tropici* type B in a combined analysis of REP, ERIC and BOX-A1R fingerprints (Pinto *et al.*, 2007).

16S rDNA gene analysis

Type A strains formed a well-supported clade in the 16S rRNA gene phylogeny, and together with *R. lusitanum*, *R. rhizogenes*, *R. tropici* type B, *R. multihospitium* and *R. miluonense* constituted a group of closely related species, hereby designated the —*R. tropici* group || (Fig. 1). The 16S rDNA gene sequences of type A strains showed $\geq 99.8\%$ identity to each other and $\leq 99.4\%$ identity with other strains in the —*R. tropici* group || (Suppl. Table S3). Willems and Collins (1993) described an insertion of seventy-two nucleotides in the V1 region of the 16S rRNA gene of the CFN 299^T strain, that was present in several type A but not in type B strains (van Berkum *et al.*, 1994). In this study, presence of the insertion was confirmed in the Brazilian type A strains CPAO 29.8, 77, BR 10043 and BR 828, and also in the Mexican strains CCGE521, CCGE522 and CCGE523. The insertion was absent in all available sequences from the *Rhizobium* type strains with a complete V1 region sequenced. Thus, the 72-bp insertion seems to be a characteristic of type A strains.

Another genetic difference in the ribosomal operon between type A and type B strains was highlighted in a study by Pinto *et al.* (2007), in which strains CFN 299^T, CPAO 29.8 and 77 showed similar profiles in the ARDRA analysis of the 23S rRNA and were separated from the cluster including *R. tropici* CIAT 899^T.

MLSA analysis

Partial sequences of five protein-coding genes, *recA*, *gltA*, *rpoA*, *glnII* and *rpoB*, were analyzed. The percentage nucleotide identities among type A strains were higher than between this group and the type strains of the other species in the —*R. tropici* group || (Suppl. Table S3). The differences separating *R. tropici* type B and type A strains were as high as those found between the latter group and at least one of the other four closely related species for *gltA*, *rpoA*, *glnII* and *rpoB* (Suppl. Table S3), thus supporting the differentiation of type A from *R. tropici* type B. Type A sequences formed well-supported clades different from those containing type B sequences in all single gene phylogenies (Supplementary Figs. S3-S7). In the phylogeny constructed with the concatenated alignments (Fig. 2), the type A strains formed a sister clade to a highly supported group containing *R. tropici* type B, *R. multihospitium* and *R. miluonense*. *R. lusitanum* occupied an intermediate position between

the above species and *R. rhizogenes*, with the latter being the basal species in the —*R. tropici* group. ||

DNA-DNA hybridization

Type A strains shared high levels of DNA-DNA relatedness ($\geq 78.8\%$). The representative CFN 299^T strain showed 45.5, 37.5, 38.2, 33.2 and 28.7% hybridization values with *R. lusitanum* P1-7^T, *R. miluonense* CCBAU41251^T, *R. tropici* CIAT899^T, *R. multihospitium* CCBAU83401^T and *R. rhizogenes* IAM13570^T, respectively. These data are consistent with the previously reported 39% DNA-DNA hybridization value between CFN 299^T and CIAT 899^T (Martínez-Romero *et al.*, 1991), which is below the threshold for species definition (Coenye *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 1996). Other studies have also shown low DNA-DNA hybridization values between CFN 299^T and strains belonging to the —*R. tropici* group || (Gu *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006). All these data support the differentiation of type A strains from all the species in the —*R. tropici* group || .

Features distinguishing type A from *R. tropici* type B strains and related species

In the 1991 description of *R. tropici* as a novel species, type A and B strains formed well separated groups from data derived from multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) analysis with eight metabolic enzymes (Martínez-Romero *et al.*, 1991). The groups were separated at a genetic distance over 0.5, which was used as the limit to distinguish species (Musser *et al.*, 1987; Selander *et al.*, 1985). Further analysis with glutamine synthetase (GS) II isoenzymes clearly distinguished type A and type B strains (Taboada *et al.*, 1996).

Megaplasmiids of similar size (over 1,700 kb) were observed in both type A and type B strains but they were found to be subgroup specific, indicating that type A and B strains belong to different taxons (Geniaux *et al.*, 1995). Such megaplasmiids may correspond to chromiids (Ormeño *et al.*, unpublished) as defined by Harrison *et al.* (2010), and should have taxonomic value in contrast to conjugative plasmids. Other difference, reported elsewhere, include a hup (uptake hydrogenase)-positive phenotype of type A strains, whereas only a few type B strains showed this characteristic (van Berkum *et al.*, 1994). In addition, the

type A reference strain CFN 299^T belongs to a cluster different from that of the *R. tropici* type B strain CIAT 899^T by FAME analysis of seventeen fatty acids (Hungria *et al.*, 2000).

All type A strains analyzed in this study showed similar reactions in the morpho-physiological tests. Known traits distinguishing type A from type B strains first reported by Martínez-Romero *et al.* (1991) and further described by Hungria *et al.* (2000) and Pinto *et al.* (2007), such as colony morphology, antibiotic-resistance patterns, growth on LB or PY without Ca were confirmed (Table 2). *R. tropici* type B can tolerate 40 °C while type A strains grew very poorly at that temperature. Novel differences between the two groups were found in this study (Table 1). Both strain types produce acid in YMA medium but only colonies from type A strains acquire a yellow color when the medium is supplemented with bromothymol blue. Besides being more sensitive to several antibiotics than type B strains, type A strains are also more sensitive to the fungicides captan and thiram. Additionally, fifteen out of the forty-nine tests in the API 50CH kit differentiated the strain types (Table 1); however, it is noteworthy that strains giving a negative reaction with this assay may use the carbon source in question when tested by other methods (our own unpublished data).

All differences in genetic and phenotypic properties between type A strains and *R. tropici* type B reported in this and in previous studies justify considering type A strains as members of a distinct species, for which the name *R. leucaenae* is proposed. This novel species can also be differentiated from other species of the —*R. tropici* group || by sequence analysis, as mentioned previously, and by the phenotypic traits presented in Table 2.

R. leucaenae strains have been isolated in several regions of Brazil (Grange; Hungria, 2004; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Mercante *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2007). Although these regions encompass a variety of ecosystems, *R. leucaenae* occurs abundantly in the Cerrados savannah, which occupies about 25% of Brazil. In that region, *R. leucaenae* represented 79% and 15% of the rhizobial population obtained using *L. leucocephala* and common bean as trap hosts, respectively (Mercante *et al.*, 1998). *R. leucaenae* has also been found in the state of Veracruz, Mexico, in nodules of *G. sepium* (Acosta-Durán & Martínez-Romero, 2002). In Zacatecas, the largest bean-growing area in Mexico, a low proportion (less than 10%) of the nodule bacterial isolates from beans were identified as *R. leucaenae* based on the analysis of 16S rRNA or *rpoB* gene sequences (our own unpublished data).

Description of *Rhizobium leucaenae* sp. nov.

Rhizobium leucaenae (leu.ca.e'na.e. N.L. gen. n. leucaenae, of Leucaena, referring to the isolation source of many strains of this species, root nodules of *Leucaena*).

Gram-negative, aerobic, non-spore forming rods. Colonies on YMA medium are circular, flat, white, opaque, dry, with low to moderate production of mucus and usually 2 to 4 mm in diameter within 2 to 3 days of incubation at 28°C. Strains acidify the YMA medium after 3 days. Can tolerate 37 °C and grow weakly at pH 4; however, optimum growth occurs at pH 5 to 7 and at 25 to 28 °C. Strains do not grow in LB medium or PY minus Ca and are sensitive to chloramphenicol (50 µg l⁻¹) and kanamycin (5 µg l⁻¹). As sources of carbon, they use D-arabinose, D-arabitol, D-cellobiose, D-fructose, D-fructose, D-galactose, D-galactose, D-glucose, D-lyxose, D-mannose, D-ribose, glycerol, L-arabitol, L-fucose, L-sorbose, mannitol and xylitol. At the molecular level, the species can be differentiated from other *Rhizobium* species by DNA-DNA hybridization experiments, 16S-rRNA sequencing, and MLSA analysis (with *recA*, *gltA*, *rpoA*, *glnII* and *rpoB* genes). Strains induce the formation of root nodules and fix N₂ with *L. leucocephala*, *L. esculenta*, *G. sepium* and *P. vulgaris*.

The type strain of this species is CFN 299^T (=USDA 9039^T; =LMG 9517^T; UMR1026^T; =CENA 183T; =SEMIA 4083^T), isolated from an effective nodule of *P. vulgaris* in Brazil.

Acknowledgments

The work was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), MCT/MAPA (577933/2008), CNPq-Universal (470162/2009-0), Repensa (562008/2010-1), and PAPIIT IN200709. R.A. Ribeiro acknowledges a PhD fellowship from Fundação Araucária (Paraná, Brazil) and M. Hungria a researcher fellowship from CNPq (300698/2007-0). M.A. Rogel was a Ph.D. student in the Ciencias Biológicas program at UNAM and received a fellowship from CONACYT. The laboratories have a bilateral project CNPq/CONACYT (490048/2009-9). The authors thank Ligia M. O. Chueire, Pâmela Menna and Jesiane S. Batista (Embrapa Soja) for help in several steps of this work.

References

- Acosta-Durán, C. & Martínez-Romero, E. (2002).** Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology* **178**, 161-164.
- Achtman, M. & Wagner, M. (2008).** Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 431-440.
- Amarger, N., Macheret, V. & Laguerre, G. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 996-1006.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M. R. & Laguerre, G. (1994).** *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant and Soil* **161**, 147-156.
- Anyango, B., Wilson, K. J., Beynon, J. L. & Giller, K. E. (1995).** Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4016-4021.
- Bouzar, H., Jones, J. B. & Hodge, N. G. (1993).** Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology* **83**, 733-739.
- Coenye, T., Gevers, D., De Peer, Y. V., Vandamme, P. & Swings, J. (2005).** Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 147-167.
- Diouf, A., de Lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martínez-Romero, E. & Gueye, M. (2000).** Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 159-170.
- Geniaux, E., Flores, M., Palacios, R. & Martínez, E. (1995).** Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 392-394.
- Grange, L. & Hungria, M. (2004).** Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1389-1398.
- Grange, L., Hungria, M., Graham, P. H. & Martínez-Romero, E. (2007).** New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 867-876.
- Gu, C. T., Wang, E. T., Tian, C. F., Han, T. X., Chen, W. F., Sui, X. H. & Chen, W. X. (2008).** *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1364-1368.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010).** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**, 307-321.

- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Han, T. X., Wang, E. T., Wu, L. J., Chen, W. F., Gu, J. G., Gu, C. T., Tian, C. F. & Chen, W. X. (2008).** *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* **58**, 1693-1699.
- Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D. & Young, J. P. W. (2010).** Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends in Microbiology* **18**, 141-148.
- Hernández-Lucas, I., Rogel-Hernández, M. A., Segovia, L., Rojas-Jiménez, K. & Martínez-Romero, E. (2004).** Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 703-706.
- Hungria, M., Campo, R. & Mendes, I. (2003).** Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils* **39**, 88-93.
- Hungria, M., Andrade, D. d. S., Chueire, L. M. d. O., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F. J. & Megías, M. (2000).** Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1515-1528.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D. S. & Campo, R. J. (2006).** Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology* **32**, 210-220.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M. & Willems, A. (2007).** Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 489-503.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P. & Pardo, M. A. (1991).** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 417-426.
- Mercante, F. M., Cunha, C. O., Stralioatto, R., Ribeiro-Junior, W. Q., Vanderleyden, J. & Franco, A. A. (1998).** *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian —Cerrado || region. *Revista de Microbiologia* **29**, 49-58.
- Musser, J. M., Bemis, D. A., Ishikawa, H. & Selander, R. K. (1987).** Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Bacteriology* **169**, 2793-2803.
- Pinto, F. G. S., Hungria, M. & Martins Mercante, F. (2007).** Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 1851-1864.
- Posada, D. (2008).** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253-1256.

- 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. *Research in Microbiology* **160**, 297-306.
- Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E. & Martínez-Romero, E. (2009).** Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiology Ecology* **67**, 103-117.
- Sawada, H. & Ieki, H. (1992).** Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann Phytopath Soc Japan* **58**, 37-45.
- Selander, R. K., McKinney, R. M., Whittam, T. S., Bibb, W. F., Brenner, D. J., Nolte, F. S. & Pattison, P. E. (1985).** Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **163**, 1021-1037.
- Taboada, H., Encarnacion, S., Vargas, M. D. C., Mora, Y., Martínez-Romero, E. & Mora, J. (1996).** Glutamine synthetase II constitutes a novel taxonomic marker in *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* Species. *International Journal of Systematic Microbiology* **46**, 485-491.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. & Velazquez, E. (2006).** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2631-2637.
- van Berkum, P., Navarro, R. B. & Vargas, A. A. (1994).** Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 554-561.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.
- Velázquez, E., Palomo, J. L., Rivas, R., Guerra, H., Peix, A., Trujillo, M. E., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Wabiko, H. & other authors (2010).** Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Systematic and Applied Microbiology* **33**, 247-251.
- Willems, A. & Collins, M. D. (1993).** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Microbiology* **43**, 305-313.

Table 1 – New distinctive features between *R. leucaenae* sp. nov. (former *R. tropici* type A) and *R. tropici* (former *R. tropici* type B) obtained in this study. +, positive; w, weak reaction; –, negative reaction or growth.

Characteristic	<i>R. leucaenae</i>	<i>R. tropici</i>
Carbon source utilization *		
D-Adonitol	w	–
D-Arabinose	+	w
D-Arabitol	+	–
L-Arabitol	+	–
D-Cellobiose	+	–
L-Fucose	+	–
Metil- α -D-Glucopyranoside	w	–
D-Fructose	+	–
D-Glucose	+	w
Glycerol	+	–
D-Lyxose	+	–
D-Mannose	+	–
L-Rhamnose	w	–
D-Sorbitol	w	+
D-Tagatose	w	+
Resistant to ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)		
Captan (50)	–	+
Thiram (25)	–	+

* Carbon source utilization was evaluated with the API 50CH kit (BioMérieux).

Table 2 – Distinctive phenotypic features of *R.leucaenae* sp. nov. and phylogenetically related species.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Utilization as sole carbon source of:						
Sodium acetate	-	-	+	-	-	-
D-Amygdalin	+	-	+	+	+	+
DL-Arginine	-	-	-	+	+	-
DL-Aspartic acid	-	-	+	+	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	+	+	+	+	+
Sodium formate	-	-	-	+	-	-
Glycine	-	-	+	-	-	-
Inulin	-	-	+	-	-	-
Malate	-	+	+	+	+	ND
Melezitose	-	-	+	-	-	+
DL-proline	-	-	+	+	-	-
Sodium pyruvate	+	+	+	+	+	-
Sorbose	+	-	+	+	+	-
Utilization as sole nitrogen source of:						
DL-Alanine	+	+	+	+	+	+
D-threonine	-	-	-	+	-	-
L-threonine	-	-	-	+	+	-
Growth in/at:						
PY without Ca	-	+	+	+	+	+
LB	-	+	+	+	-	-
37 °C	+	+	+	+	+	-
40 °C	w	+	-	-	-	-
1% NaCl	-	+	w	+	-	-
pH 4	w	+	-	+	-	ND
Resistant to ($\mu\text{g ml}^{-1}$):						
Chloramphenicol (50)	-	+	w	+	-	-
Kanamycin sulfate (5)	-	-	w	+	-	+

Taxa: 1, *R. leucaenae* (former *R. tropici* type A); 2, *R. tropici* (former *R. tropici* type B); 3, *R. lusitanum*; 4, *R. multihospitium*; 5, *R. miluonense*; 6; *R. rhizogenes*. +, growth, -, no growth; w, weak growth; ND, not determined. Data obtained in this study or compiled from the original studies describing the species, or from Amarger *et al.* (1997), Bouzar *et al.* (1993), and Sawada and Ieki (1992). Only characteristics with consistent data between studies were included.

Figure legends:

Fig. 1 – Part of a maximum likelihood phylogeny of the 16S rRNA gene showing the relationships between *R. leucaenae* strains (in bold) and other type or reference strains from closely related species (the complete phylogeny containing a larger number of reference sequences is available as Suppl. Fig. S2). GenBank accession numbers are shown in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.

Fig. 2 – Maximum likelihood phylogeny of five concatenated protein-coding genes (*recA* + *gltA* + *rpoA* + *glnII* + *rpoB*) showing the relationships between *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers for each gene and strain are given in Supplementary Table S1. Only node supports higher than 80% are shown.

Fig. 1

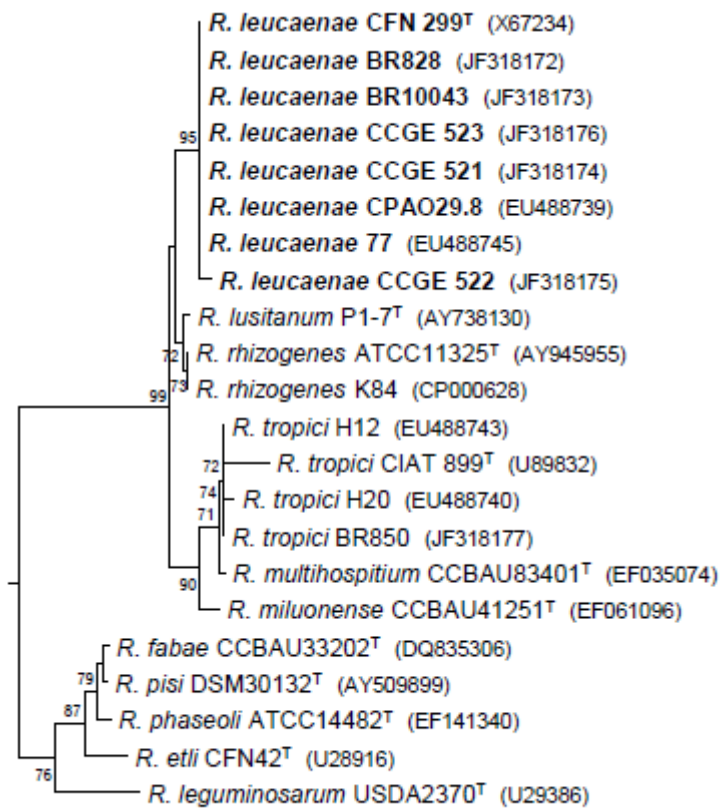
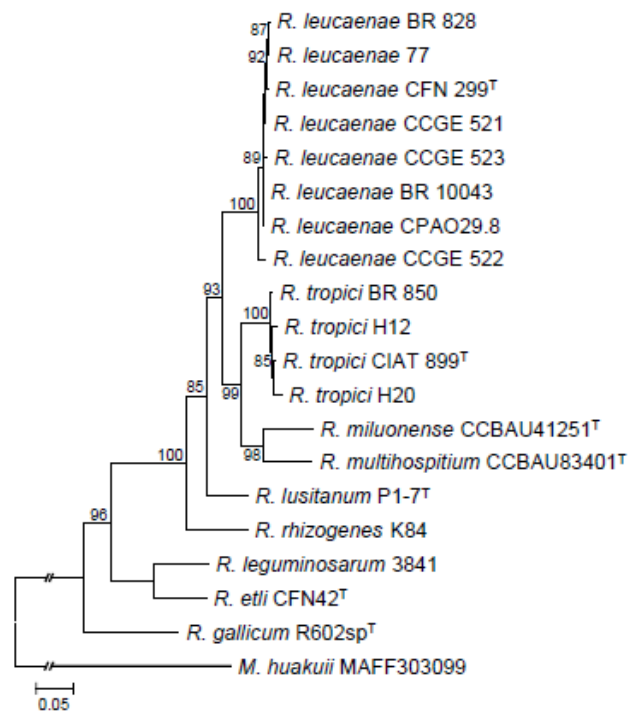


Fig. 2



Supplementary Data

Table S1 – GenBank accession numbers of the sequence used in this study.

Species/strain name	16S rDNA	<i>recA</i>	<i>gltA</i>	<i>rpoA</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>
<i>R. leucaenae</i>						
CFN 299 ^T	X67234	EU488817	EU488806	EU488845	EU488777	EF027933
BR 828	JF318172*	JF318193	JF318184	JF318199	JF318178	JF318208
BR 10043	JF318173	JF318193	JF318185	JF318200	JF318179	JF318209
CCGE 521	JF318174	JF318193	JF318186	JF318201	JF318180	JF318210
CCGE 522	JF318175	JF318193	JF318187	JF318202	JF318181	JF318211
CCGE 523	JF318176	JF318193	JF318188	JF318203	JF318182	JF318212
CPAO 29.8	EU488739	EU488812	EU488798	EU488843	EU488781	JF318214
77	EU488745	EU488813	EU488795	EU488831	EU488786	JF318213
<i>R. tropici</i>						
CIAT 899 ^T	U89832	AJ294373	EU488803	EU488833	EU488791	EF457940
BR 850	JF318177	JF318198	JF318189	JF318204	JF318183	JF318215
H 12	EU488743	EU488814	EU488804	EU488838	EU488788	JF318216
H 20	EU488740	EU488816	EU488799	EU488839	EU488792	JF318217
BR 859		DQ682649				
<i>R. rhizogenes</i> ATCC11325 ^T	AY945955	AM182126			FJ816281	
<i>R. rhizogenes</i> K84	CP000628	CP000628	CP000628	CP000628	CP000628	CP000628
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	AY738130	DQ431674	JF318190	JF318205	EF639841	JF318218
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	EF061096	HM047131	JF318191	JF318206	HM047120	JF318219
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	EF035074	EF490029	JF318192	JF318207	EF490040	JF318220
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	U28916	CP000133	CP000133	CP000133	CP000133	CP000133
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T	U29386	AM182125	AM181616		AF169586	
<i>R. leguminosarum</i> USDA2671		EU488811	EU488800	EU488837	EU488784	
<i>R. leguminosarum</i> 3841		AM236080	AM236080	AM236080	AM236080	AM236080
<i>R. gallicum</i> R602sp ^T	U86343	AM182124	EU488805	EU488840	EU488785	EF027930
<i>M. huakuii</i> MAFF303099		BA000012	BA000012	BA000012	BA000012	BA000012

* Sequences generated in this study are shown in bold

Table S2 – Strains used in this study.

Species/strain name	Other strain nomenclature	Host species	Geographical origin	Reference or source
<i>R. leucaenae</i> CFN 299 [†]	USDA 9039 [†] , LMG 9517 [†] , UMR1026 [†] , CENA 183 [†] , SEMIA 4083 [†] , CNPSo 141 [†]	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
CPAO 29.8 77	CNPSo 229 CNPSo 224	<i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i>	Mato Grosso do Sul, Brazil Pernambuco, Brazil	(Pinto <i>et al.</i> , 2007) (Grange & Hungria, 2004)
BR 10043		<i>P. vulgaris</i>	Brazil	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
BR 828		<i>Leucaena leucocephala</i>	Brazil	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
CCGE 522	DOR132	<i>P. vulgaris</i>	Zacatecas, Mexico	This study
CCGE 523	DOR35	<i>P. vulgaris</i>	Zacatecas, México	This study
CCGE 521	BAT91	<i>P. vulgaris</i>	Zacatecas, México	This study
<i>R. tropici</i> CIAT 899 [†]	USDA 9030 [†] , ATCC 49672 [†] , UMR1899 [†] , TAL 1797 [†] , HAMB1 1163 [†] , CM0 [†] , SEMIA 4077 [†] , DSM 11418 [†] , BR 322 [†] , CNPSo 142 [†]	<i>P. vulgaris</i>	Colombia	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
BR 850		<i>L. leucocephala</i>	Brazil	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
H 12	SEMIA 4088, CNPSo 230	<i>P. vulgaris</i>	Cerrados, Brazil	Mostasso <i>et al.</i> (1992)
H 20	CNPSo 231	<i>P. vulgaris</i>	Cerrados, Brazil	Mostasso <i>et al.</i> (1992)
<i>R. rhizogenes</i> K84				(Velázquez <i>et al.</i> , 2010)
<i>R. lusitanum</i> P1-7 [†]		<i>P. vulgaris</i>	Arcos de Valdevez, Portugal	(Valverde <i>et al.</i> , 2006)
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 [†]		<i>Halimodendron halodendron</i>	Xinjiang, China	(Han <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 [†]		<i>Lespedeza chinensis</i>	Hunan, China	(Gu <i>et al.</i> , 2008)

Table S3 – Range of percentage nucleotide identity within *R. leucaenae* and between *R. leucaenae* strains and the type strains of other *Rhizobium* species in the 16S rRNA and five protein-coding genes

Species	Gene*					
	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>gltA</i>	<i>rpoA</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>
Within						
<i>R. leucaenae</i> [†]	99.8 - 1	98.7 - 1	98.4 - 1	98.8 - 1	99.6 - 1	98.4 - 1
Between <i>R. leucaenae</i> and						
<i>R. tropici</i>	98.6 - 98.7	91.9 - 92.4	96.5 - 97.6	96.6 - 97.1	93.6 - 93.8	92.3 - 92.8
<i>R. lusitanum</i>	99.3 - 99.4	90.1 - 90.4	97.3 - 98.6	96.6 - 97.1	91.5 - 91.7	94.2 - 94.3
<i>R. rhizogenes</i>	99.3 - 99.4	91.4 - 92.1	92.2 - 93.1 [‡]	96.3 - 96.6 [‡]	89 - 89.2	93.5 - 94.3 [‡]
<i>R. multihospitium</i>	99.2 - 99.3	93.7 - 93.9	91.4 - 91.9	96.4 - 96.8	90.7 - 90.9	92.1 - 92.9
<i>R. miluonense</i>	99 - 99.1	90.6 - 90.9	90.2 - 90.8	95.2 - 95.8	94.2 - 94.4	94.2 - 94.3
<i>R. leguminosarum</i>	97.5 - 97.6	88.6 - 88.9	90.5 - 91.3	93.6 - 94.1 [§]	89 - 89.2	85.1 - 86.2

* Length of the aligned regions (bp): 16S rDNA (1325), *recA* (395), *gltA* (644), *rpoA* (628), *glnII* (519), and *rpoB* (639). GenBank accession numbers of the sequences used are given in Supplementary Table S1.

[†] Eight strains: CFN 299T, CPAO29.8, 77, CCGE 521, CCGE 522, BR 828, BR 10043.

[‡] Comparison was performed with *R. rhizogenes* K84.

[§] Comparison was performed with *R. leguminosarum* USDA 2671.

Fig. S1 – UPGMA dendrogram showing the relationships between *R. leucaenae* and *Rhizobium tropici* strains based on BOX A1-R PCR fingerprints.

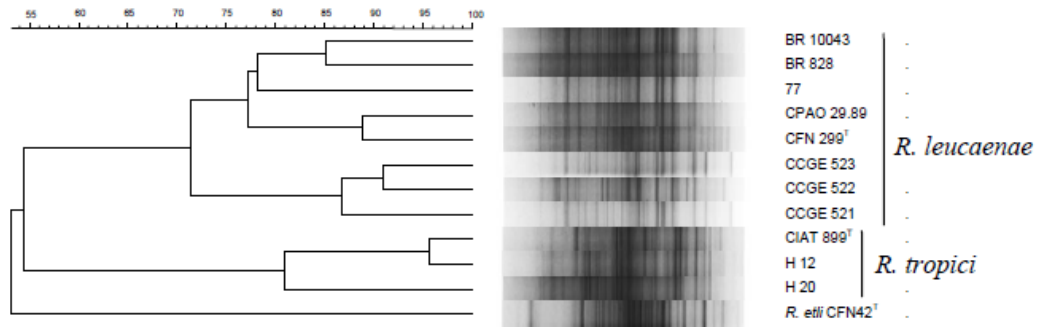


Fig. S2 – Maximum likelihood phylogeny of 16S rRNA gene sequences of *R. leucaenae* strains and other *Rhizobium* type or reference strains. GenBank accession numbers for each gene and strain are given in Supplementary table S1. Only node supports higher than 80% are shown.

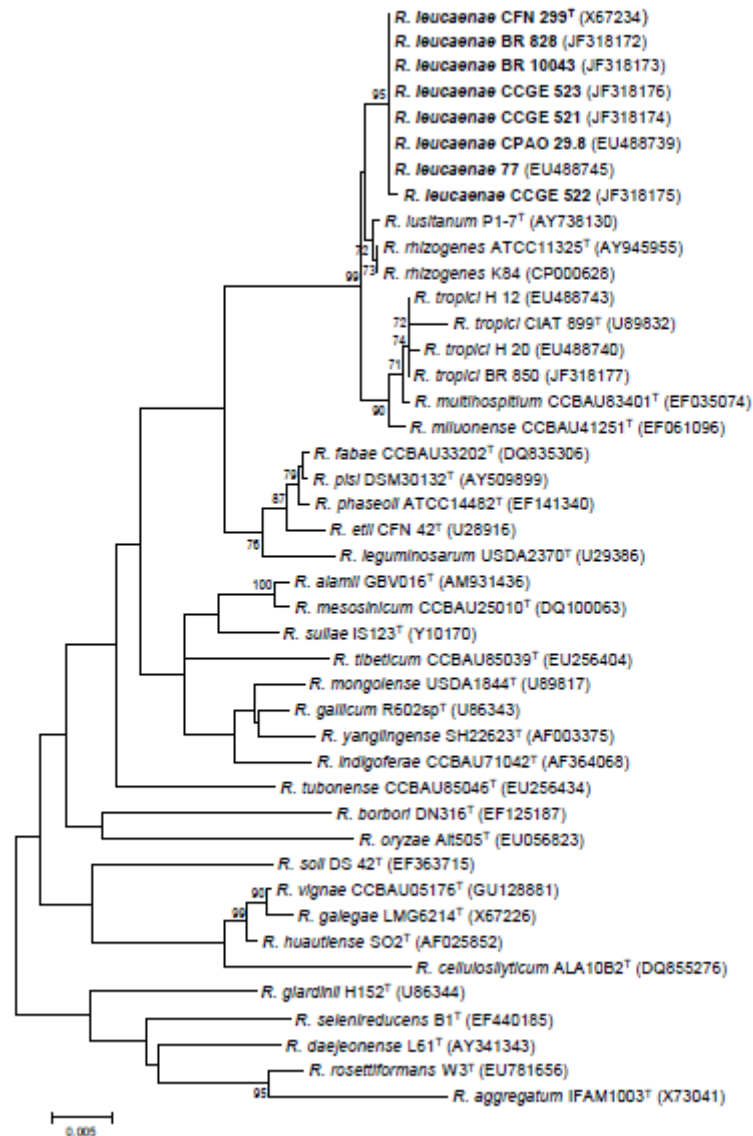


Fig. S3 – Maximum likelihood phylogeny of *recA* gene sequences of *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.

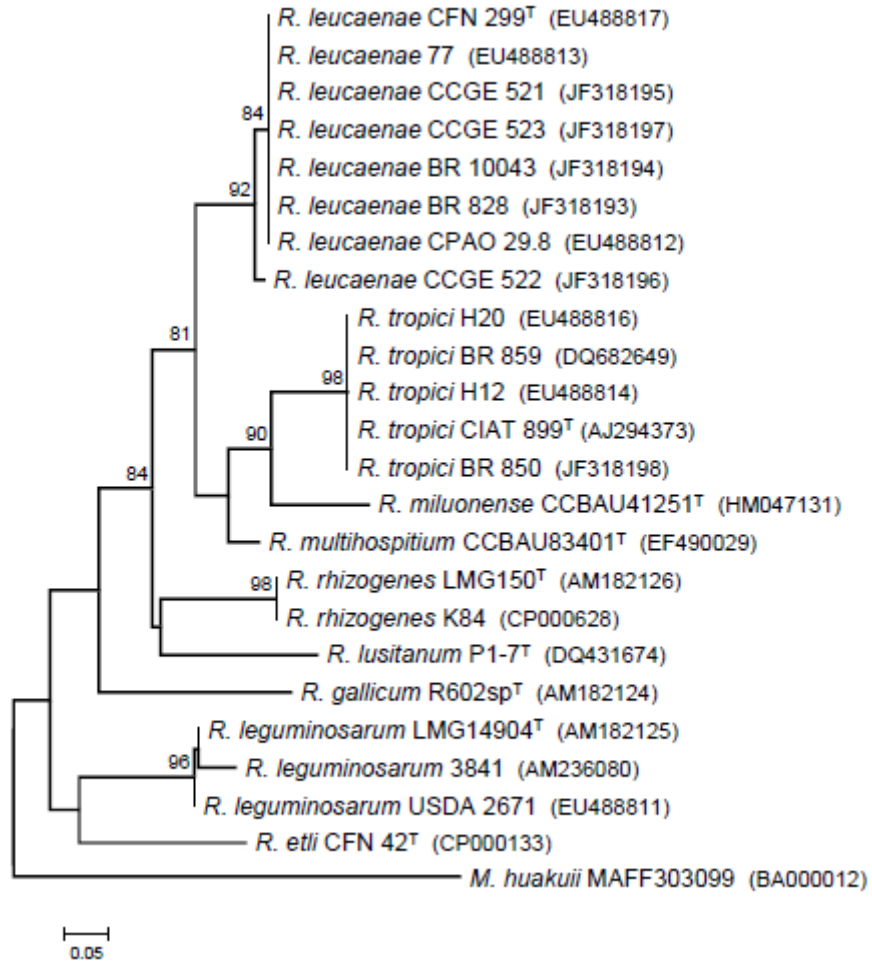


Fig. S4 – Maximum likelihood phylogeny of *gltA* gene sequences of *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.

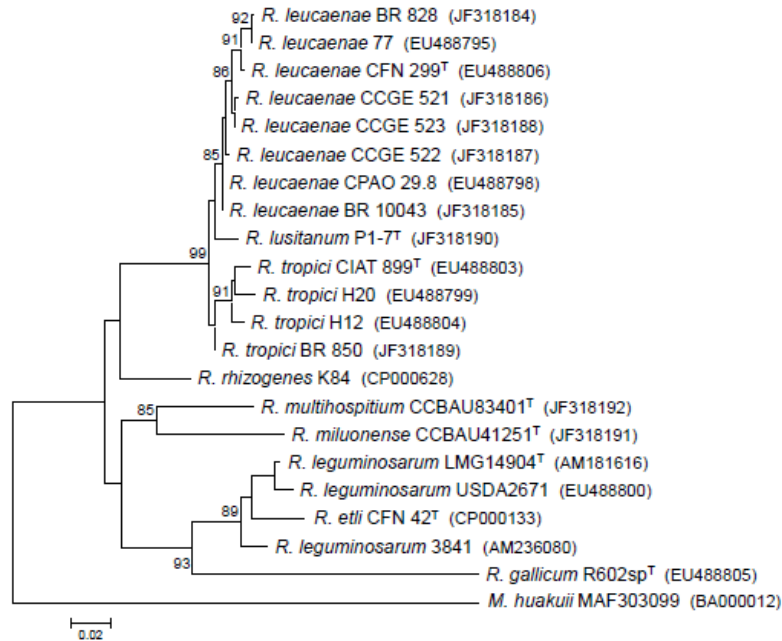


Fig. S5 – Maximum likelihood phylogeny of *rpoA* gene sequences of *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.

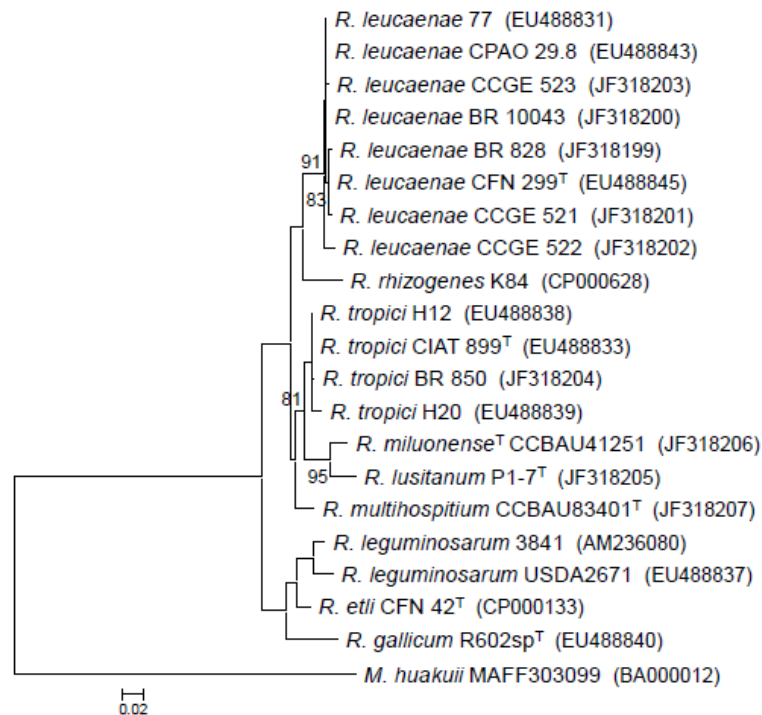


Fig. S6 – Maximum likelihood phylogeny of *glnII* gene sequences of *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.

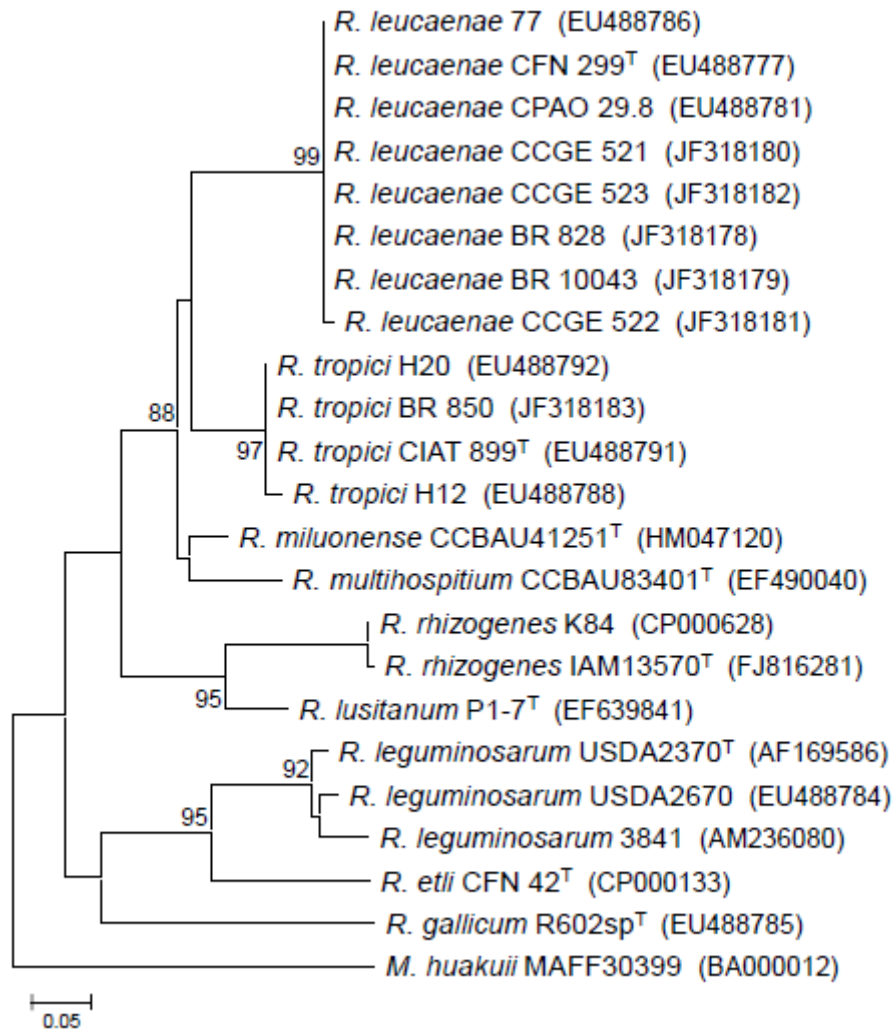
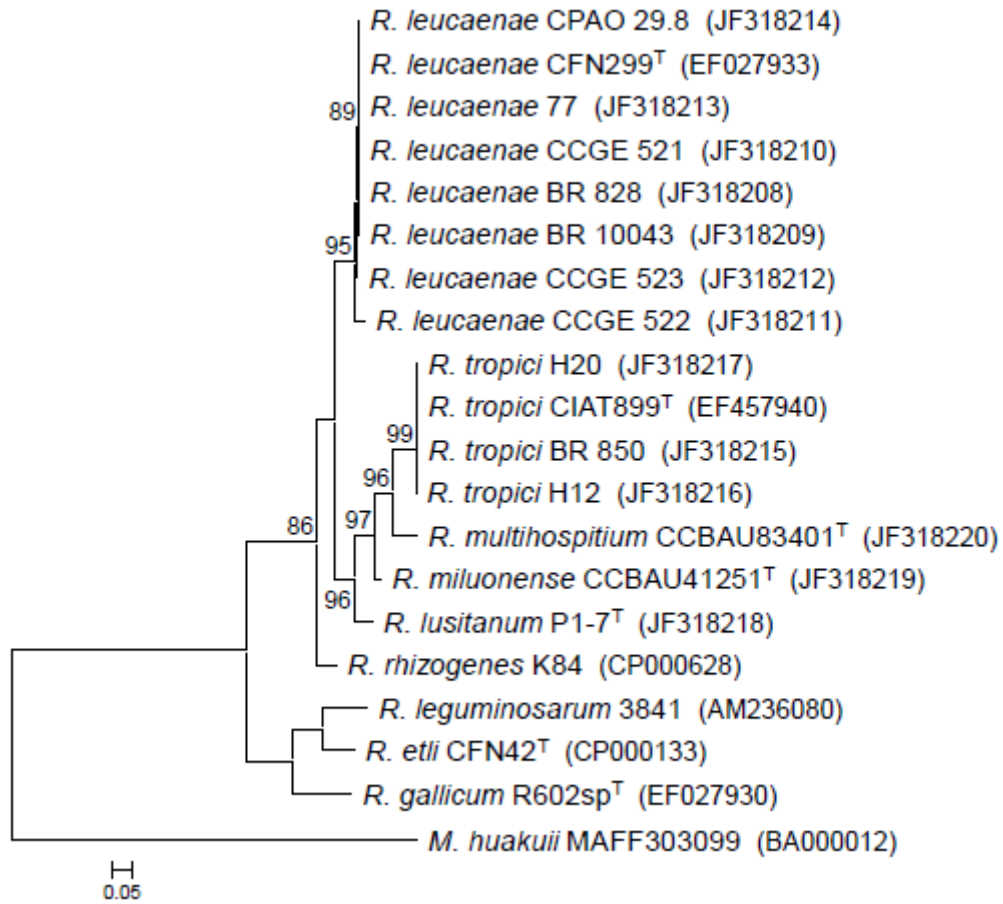


Fig. S7 – Maximum likelihood phylogeny of *rpoB* gene sequences of *R. leucaenae* strains and other type or reference strains from closely related species. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Only node supports higher than 80% are shown.



5 ESTUDO 2**MLSA CLARIFYING EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS BETWEEN *R. ETLI*, *R. LEGUMINOSARUM*, *R. TROPICI* AND *R. RADIOBACTER***

**Renan Augusto Ribeiro^{1,2,4}, Esperanza Martínez-Romero⁵, Peter H. Graham[†],
Mariangela Hungria^{1,2,3,*}**

¹Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil; ²Universidade Estadual de Londrina, Dept. Microbiologia, Londrina, PR, Brazil; ³Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil; ⁴Fundação Araucária, Curitiba, PR, Brazil; ⁵Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México; [†]In memoriam.

E-mail:

renanribeiro83@hotmail.com

*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

MLSA CLARIFYING EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS BETWEEN *R. ETLI*, *R. LEGUMINOSARUM*, *R. TROPICI* AND *R. RADIOBACTER*

**Renan Augusto Ribeiro^{1,2,4}, Esperanza Martínez-Romero⁵, Peter H. Graham[†],
Mariangela Hungria^{1,2,3,*}**

¹Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil; ²Universidade Estadual de Londrina, Dept. Microbiologia, Londrina, PR, Brazil; ³Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brazil; ⁴Fundação Araucária, Curitiba, PR, Brazil; ⁵Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México; [†]In memoriam.

E-mail:

renanribeiro83@hotmail.com

Introduction

Bacteria of the order Rhizobiales are capable of forming highly specific structures (nodules) on the roots of several plant species of the family *Leguminosae* (=Fabaceae). These prokaryotes can transform the atmospheric nitrogen (N₂) to ammonia, that will be incorporated into organic nitrogen compounds and will be transferred to the host plant. In exchange, carbon sources from the plants are sent to the microsymbiont. This mutually beneficial association (symbiosis) results from millions of years of co-evolution, and the process is designated as biological nitrogen fixation, and occurs naturally or through the inoculation of proper rhizobia to each culture (Young, 1992; Raymond et al., 2004; Rivas et al., 2009).

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a very important legume, representing a source of nutrients in many undeveloped and developing countries, especially in South and Central Americas, in Africa and some countries of Asia (Velazquez et al., 1992). It has been shown that the legume has originated in Central and South America, with wild ancestors distributed from Mexico to northern of Argentina. The domestication in South America probably occurred with alleles from southern Peru to the north of Argentina and in Mesoamerica with alleles from Mexico to the northern region of South America, including Colombia, Peru and Ecuador (Gepts, 1990; Gepts; Debouck, 1991).

In early 1930s, rhizobia classification performed by Fred et al. (1932) was based on the cross-inoculation concept, and the symbionts of common bean were classified as *Rhizobium phaseoli*. The concept was later modified, as several distinct bacteria were shown to nodulate the same host plant. Therefore, fifty years later, by using a polyphasic approach of morpho-physiological and genetic properties the symbionts of common bean were reclassified as *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Jordan, 1984).

In the last thirty years, efforts worldwide resulted in the isolation of a variety of rhizobial strains from several new areas and a high level of biodiversity has then been reported. With the characterization of these new isolates, in addition to the great advances achieved in the use of molecular tools, several new species have been described. Accordingly, currently the group of rhizobia that nodulates common bean comprises the following species: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. lusitanum* (Valverde et al., 2006), *R. gallicum*, *R. giardinii* (Amarger et al., 1997) and *R. multihospitium* (Han et al., 2008).

Despite the high diversity of rhizobia found in American soils, studies have shown so far that *R. etli* is the dominant species in the Mesoamerica region, while *R. tropici* is dominant in acidic soils of Brazil and other tropical countries (Martinez-Romero, 1991, 2003; Mercante et al., 1998; Hungria et al., 1993; Graham, 1994; Grange et al., 2007; Pinto et al., 2009). There are still controversies about *R. leguminosarum*, originally defined as of European origin (Segovia et al., 1993), but also broadly found in Brazil (e.g. Mostasso et al., 2002; Stocco et al., 2008; Andrade et al., 2002). Furthermore, genetic relatedness of *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. phaseoli based on the 16S rRNA is very high, thus making it often difficult to delineate and boundaries between the two species (Segovia et al., 1993).

Nowadays, the ribosomal gene 16S has been broadly used over and represents the backbone of phylogeny and taxonomy studies. However, the single use of the 16S rRNA may be limited by its high level of conservation and the possibility of horizontal gene transfer (HGT) (Sullivan et al., 1996; van Berkum et al., 2003; Vinuesa et al., 2005; Gevers et al., 2005; Martens et al., 2007). Consequently, the multilocus sequence analysis (MLSA) approach has been increasingly employed in many taxonomy and phylogeny studies of several bacterial genera, proving to shown high correlation with the DNA-DNA hybridization method and the 16S rRNA gene (e.g., Gevers et al, 2005; Martens et al., 2007; Martens et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Menna et al., 2009).

As there are still many doubts about the evolutionary relationships between the common bean rhizobia in South America and Central Americas, in addition to an impressive biodiversity of rhizobia in both those sites and in other sites as Brazil where the legume has been cropped by centuries, the goal of our work was to get a better understanding the phylogenetic relationships, by using the MLSA approach, of fifteen common bean *Rhizobium* strains, isolated from Mexico, Ecuador and Brazil by using an MLSA approach.

Material and Methods

Strains and DNA extraction

A total of fifteen rhizobial isolates from nodules of common-bean were used in this study, isolated by Dr. Peter H. Graham, University of Minnesota, USA. The sites of isolation and other relevant information are given in Table 1. Isolates were purified on yeast extract-mannitol agar (YMA) medium (Vincent, 1970) containing Congo red (0.00125%). Stocks were prepared in YMA and kept at -80°C (under 30% of glycerol) for long-term

storage and at 4°C as working cultures. The strains are deposited at the “Culture Collection of Diazotrophic and PGPR Bacteria” of Embrapa Soja (<http://www.bmrc.lncc.br>).

Total genomic DNA of each isolate was extracted from bacterial batch cultures grown in YM broth until late exponential phase (10^9 cells mL⁻¹). Extraction of DNA was performed as described before (Kaschuk et al., 2006), and purification and maintenance of stocks were as described by Menna et al. (2006).

Morphological characterization

Isolates were characterized in relation to morpho-physiological properties, including colony morphology (form, elevation, borders, surface, muco production, consistency), and growth in YM medium containing bromothymol blue or Congo red dyes (Hungria et al., 2001). The acid/alkaline reaction was also verified in YMA plates, pH 7.0, containing 25 µg ml⁻¹ of bromothymol blue.

Amplification and sequencing of genes

In addition to the 16S rRNA, the following housekeeping genes were used in this study: *gltA*, *glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoA* and the primers for the amplification were obtained from the literature and are listed in Table 2. The approximate size of each gene and the size of the amplified fragments are also listed in Table 2.

The PCR reactions were carried out in a volume of 50 µL: dNTPs (300 µM of each); PCR-buffer (Tris-base 20 mM pH 8.4 and KCl 50 mM); primers (15 pmol of each); Taq DNA polymerase (1.0 U); DNA (20 ng). The conditions for PCR amplification were as described before for the following genes: 16S rRNA (Menna et al., 2006), *gyrB* (Martens et al., 2008), *recA* (Gaunt et al., 2001), *gltA* (Martens et al., 2007), *rpoA* (Ribeiro et al., 2009) and *glnII* (Stackebrandt et al., 2002). For purification of the PCR-products, the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) was used, according to the manufacturer’s instructions. Sample concentration was checked by electrophoresis of 2 µL PCR products on 1% agarose gel and staining with ethidium bromide. After purification, the sequencing reaction was performed as described by Ribeiro et al. (2009), and the sequencing was performed on a MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences) capillary sequencer, according to the manufacturer’s instructions.

High-quality sequences obtained for each isolated were assembled into contigs using the programs Phred (Ewing et al., 1998), Phrap (www.phrap.org) and Consed (Gordon et al., 1998). Sequences confirmed in the 3' and 5' directions were submitted to the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to seek for significant alignments. Accession numbers given to the genes are listed in Table 5.

Phylogenetic analysis

Multiple alignments for each gene were performed with CLUSTAL_X version 1.83 (Thompson et al., 1997) using the sequences obtained in this work and the sequences of the following type or reference strains obtained from the GenBank Data Library (access numbers are given in the phylogenetic tree): *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419^T, *Ensifer meliloti* strain 1021^T, *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) strain C58, *Rhizobium tropici* strain CIAT 899^T (type B), *R. etli* bv. *phaseoli* strain CFN 42^T, *R. leguminosarum* bv. *Viciae* strain 3841, *R. giardinii* bv. *giardinii* strain H152^T, *R. gallicum* bv. *gallicum* strain R602^T, *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110 and *Mesorhizobium loti* strain MAFF 303099^T. Some type strains, particularly those that have been described more recently, do not have sequences available in databases of all studied genes, thus were not included in all trees. However, to provide more information about the strains from our study, the 16S rRNA and *recA* of the following type strains were added (accession numbers shown in the trees): *Rhizobium cellulosilyticum* strain ALA10B2^T; *Rhizobium rhizogenes* strain LMG 152^T; *Rhizobium galegae* strain LMG 6214^T; *Rhizobium huautlense* strain SO2^T; *Rhizobium lusitanum* strain P1-7^T; and *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571^T. Likewise, reference strains of *R. tropici* type A (CFN 299) and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (USDA 2671) were not included in the *gyrB* and concatenated trees. *Caulobacter crescentus* CB15^T was used as outgroup. Phylogenetic trees were generated using MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004) with default parameters, K2P distance model (Kimura, 1980), and the Neighbor-Joining algorithm (Saitou & Nei, 1987). Parsimony-informative characters were also estimated in the MEGA program. Statistic support for tree nodes was evaluated by bootstrap analyses (Felsenstein, 1985) with 1,000 samplings.

Results and Discussion

Morpho-physiological characterization

Morpho-physiological characterization of the strains is shown in Table 3. In general properties were similar to bacteria belonging to the *Rhizobium* genera, e.g. the acid reaction in culture medium containing mannitol as carbon source. One difference observed among the strains was in the diameter of the colonies after five days of growth, with the Brazilian isolates 657 and 660 presenting smaller colonies than the other strains (Table 3).

Genetic Diversity

16S rRNA

Sequencing of the 16S rRNA genes resulted in aligned fragments of 1,258 bp that were used to build a phylogenetic tree. Five main groups were observed with bootstrap supports ranging from 41 to 99% (Fig. 1). The high evolutionary similarity between *R. leguminosarum* and *R. etli* is highlighted in Fig. 1, such that group I included both species with a bootstrap support of 80%, although split in two subgroups (1 and 2). The subgroup of *R. etli* CFN 42^T included also eight strains from our study, 659, 661, 664, 666, 671, 672, 679, 683, with a bootstrap support of 69%. Subgroup 2 clustered the *R. leguminosarum* USDA 2671 and 3841^T with a bootstrap support of 94%. Still in the 16S rRNA tree, strain 655 was clustered with *R. tropici* type B CIAT 899^T, while strains 660 and 657 were clustered with *R. tropici* type A (CFN 299); differences between the two types of *R. tropici* were clearly observed. Group II also include the species *R. lusitanum* and *R. rhizogenes*, with a final bootstrap support of 99 %.

Group III was formed by the type strains of *Ensifer meliloti*, *Ensifer medicae*, *R. gallicum* e *R. giardini*, while group IV was formed by the type strains of *R. galegae*, *R. huautlense* and *R. cellulosilyticum*.

Strains 673, 675, 662 and 665, together with the type strain of *R. radiobacter* were clustered in group V with a bootstrap support of 99% (Fig. 1), but clearly two subgroup were observed, one with strains 673 and 675 from Ecuador and the other with strains 662 and 665, from Mexico together with *R. radiobacter*.

As the phylogenetic data, the analysis of 16S rRNA similarity also showed low resolving power when using related rates. The similarity shows that different species as:

R. leguminosarum and *R. etli*; *R. lusitanum* and *R. rhizogenes*; *E. meliloti* and *E. medicae*, share more than 97% of similarity, considered as the limit for species definition (Gevers et al., 2005; Gevers et al., 2006; Rosseló-Mora et al., 2001). Although the analysis based on 16S rRNA presents the backbone of taxonomic classification at higher levels of genera and families, it may be insufficient to define species. Therefore, additional markers may be necessary and useful, as demonstrated in some genera (Rosseló-Mora et al., 2001; Gevers et al., 2005, 2006; Martens et al., 2008) including *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Sinorhizobium* (Martens et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; Menna et al., 2009).

Housekeeping genes: *gltA*, *glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoA*

In the last ten years, the proposal use of multiple housekeeping genes (loci) in complementation to the 16S rRNA in studies of phylogeny and taxonomy of prokaryotes has been strengthened. The chosen genes should have higher evolution rate than the ribosomal genes, but carrying sufficient conservative information to sustain phylogenetic analysis (Gaunt et al., 2001; Gevers et al., 2005; Martens et al., 2007, 2008; Stackebrandt et al., 2002; Ribeiro et al., 2009; Menna et al., 2009). In our study, the five housekeeping genes and the size of the fragments used in the analyze were as follows: 534 bp (*glnII*), 398 bp (*gltA*), 661 bp (*gyrB*), 475 bp (*recA*) e 425 bp (*rpoA*). The *gyrB* had the highest number and percentage of parsimony informative, with 284 caracteres (42,9%), while the *gltA* had the lowest number of parsimony informative with 118 characters, although proportionally similar to the other genes (29,6%) (Table 4).

To simplify the understanding and give emphasis to the strains of interest used in this study, we will consider only three groups for the trees built with the five housekeeping genes (Fig. 2): group I with the type strains of *R. leguminosarum*, *R. etli* and eight strains from our study (659, 661, 664, 666, 671, 672, 679, 683), group II with the type/reference strains of *R. tropici* and strains 655, 657 and 660, and group III, with the type strain of *R. radiobacter* and strains 662, 665, 673, 675.

Each individual tree built with each of the five genes has shown high resemblance with the tree built with the 16S rRNA, especially when the three main groups from our study are considered. However, a far greater resolution than the 16S rRNA gene was observed. In group I, the bootstrap support ranged from 80 to 98% for *glnII*, *gyrB*, *recA* and *rpoA* genes, while for *gltA*, the bootstrap was of only 35%. For all genes, the clear separation

between *R. leguminosarum* and *R. etli* was observed only with *gyrB* gene analysis, which was possible to identify strains at specific level.

In group II, the bootstrap values ranged from 74% to 94%. Excluding *gltA*, all others genes were clearly able to split the type strain of *R. tropici* type B and *R. tropici* type A. Strain 655 was clustered with type B strain while the Brazilian strains 657 and 660 were clustered with type A strain, similarly to what observed with the 16S rRNA.

In relation to group III, high bootstrap values ranging from 99% to 100%, were observed in all five trees. In each tree, the phylogenetic position of *R. radiobacter* type strain showed variability, and thus a correct assignment of the four strains from our study positioned in this group was not complete. However, it should be emphasized the clear separation, for all genes analyzed, of strains from Ecuador (662 and 665) and the strains from Mexico (673 and 675).

From all housekeeping genes, the least conclusive was *gltA*, what could be attribute to the low of parsimony informative sites (118) (Table 4). In a previous study, Ribeiro et al. (2009) also did not observe good results with the *gltA* gene, reinforcing that the use of *gltA* seems to be not a good choice for MLSA, at least for rhizobia. Based on the concept, of higher correlation with the 16S rRNA (Gevers et al., 2005), among the five housekeeping genes, the best results were obtained with the *gyrB* gene. In the phylogenetic tree obtained with this gene, the groups were clearly separated and demonstrated a good correlation, but with better resolving power than the 16S rRNA.

Concatenated analysis of *glnII*, *gltA*, *gyrB*, *recA* and *rpoA*

The analysis of the concatenated genes in the MLSA approach allows great advance in species definition in comparison to the single analysis of the 16S rRNA (Gevers et al., 2005; Martens et al., 2008). When the five gene—*glnII*, *gltA*, *gyrB*, *recA* and *rpoA*—were concatenated, resulted in 2,493 nucleotides, comprising 1142 conserved, 1310 variable and 801 parsimony informative sites. Basically, the groups observed in the concatenated tree resembled those observed in each individual tree, including that of the 16S rRNA, but with a far greater definition (Fig. 3).

The most interesting definition was observed in group I, where *R. leguminosarum* and *R. etli* were clearly separated in two subgroups. Subgroup I.1 included *R. etli* and strains 661, 664, 666 and 679; the first three strains were isolated in Mexico, while 679, occupying a more isolated position in the group is from Ecuador. The most accepted

theory is that common bean was domesticated separately in two major centers of genetic diversification, and that the Mesoamerican center or Northern group has alleles originating from Mexico to the northern region of South America, including Colombia, Ecuador and North of Peru (Kaplan, 1965, 1980; Debouck, 1986; Gepts, 1990; Gepts and Debouck, 1991). Estimates are that the domestication occurred at least 4,000 years ago (Martinez-romero et al., 2003; Rodiño et al., 2010) and there are evidences that in these primary centers *R. etli* is the dominant microsymbiont common bean (Segovia et al., 1993; Souza et al., 1994; Bernal and Graham, 2001; Martínez-Romero, 2003). Meanwhile, the analyses of the nuclear gene encoding the protein phaseolin in modern and archeological seeds have shown that the Mesoamerica could represent the primary center of origin of common bean, more specifically, Ecuador and northern Peru (Gepts, 1990; Gepts and Debouck, 1991). Therefore the phylogenetic position of strain 679 from Ecuador in subgroup I.1 could indicate an earlier origin in the *R. etli* group.

The second subgroup I.2 included type strain of *R. leguminosarum*, which was linked to four strains grouped with a high bootstrap support, of 72%; three of these strains (671, 672 and 683) are from Ecuador, and one (659) from Mexico. In the description of *R. etli*, Segovia et al. (1993) proposed the theory that after the colonization of America, common bean seeds carrying *R. etli* were introduced in Europe, where its symbiotic plasmid could have been transferred to Indigenous *R. leguminosarum*; later, the same process may have occurred from *R. leguminosarum* to *R. gallicum* and *R. giardinii* (Amarger et al., 1997).

From the results obtained in our study, it was possible to identify *R. leguminosarum* in Ecuador and Mexico, considered as the two main centers of common bean domestication. Previous studies have also identified *R. leguminosarum* in Colombia (Eardly et al., 1995), suggested as the third center of domestication of the bean, and in Brazil (Straliotto et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002; Stocco et al., 2007; Giongo et al., 2007). These evidences raises questions about the theory proposed by Segovia et al. (1993), as the transfer of the symbiotic plasmid of *R. etli* to *R. leguminosarum* might have occurred in America and then migrated to Europe, since *R. leguminosarum* could also have its origin in America, the contact of this species with *R. etli* might have occurred since the domestication of common bean (4000 years ago). The two species might have arrived together in Europe, after the colonization of America, about 500 years ago.

One major consideration of our study is that *R. etli* and *R. leguminosarum* were closely related in the analysis of the 16S rRNA, while in the MLSA a far more clear definition of each species was achieved. These results raise an intriguing question about

diversity and identification of these two species in the studies performed so far. As reviewed by Martínez-Romero (2003), there are reports of *R. etli* isolated in Mexico, Ecuador, Peru, Argentina, Brazil, Senegal, Gambia and Tunis, while *R. leguminosarum* has been reported in England, France, Spain, Colombia, Brazil and Tunis. Our results show that in many of those studies the species nomenclature could be erroneous. One example is the report of Bernal & Graham (2001), who identified two strains used in our study, 671 (UMR 1450) and 672 (UMR 1452) as *R. etli*, while by using the MLSA we have shown higher similarity with *R. leguminosarum*.

The second group in the MLSA analysis (II) was split in two subgroups of the *R. tropici* group. Strain 655 from Mexico was identified as *R. tropici* type B, a surprising result, as so far there were no reports of isolation of *R. tropici* from common bean nodules in that country, although the species has been isolated from indigenous legumes (*Gliricidia*) in Mexico (Acosta-Durán & Martínez-Romero, 2002). The origin of the symbiosis of *R. tropici* with common bean remains uncertain, but the main hypothesis is that this species is native to South America (Martínez-Romero et al., 1991), and because the majority of isolates obtained so far are from Brazil (Hungria et al., 1993, 1997, 2000; Mercante et al., 1998; Stralio et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002; Grange and Hungria, 2004; Pinto et al., 2007), this country is a strong candidate. Experimental assays have shown that the Mesoamerican bean cultivar RAB39 preferentially nodulates with *R. tropici*, whereas nodulation did not occur with wild *P. vulgaris*, using the same strain of *R. tropici* (Kipe-Nolt et al., 1992; Montealegre et al., 1995). As wild common bean is not found in Brazil (Debouck, 1986), *R. tropici* could be a microsymbiont of other indigenous host legumes, and possible candidates are species of the genera *Leucaena*, *Mimosa* and *Gliricidia*, reported to establish very effective symbioses with *R. tropici* under field conditions (Menna et al., 2006; Germano et al., 2006; Mercante et al., 1998). It could be that after the introduction of beans in Brazil, *R. tropici* became a symbiont of the legume. *R. tropici* was initially isolated in Colombia, therefore, another hypothesis is that species has been brought from this country to Brazil, for indigenous nomadic people, possibly through seeds and were dispersed. It should also be considered that the presence of *R. tropici* as the microsymbiont of common bean plants in other countries like France (Amarger et al., 1994) and Kenya (Anyango et al., 1995) could also be explained by trade or migration. In the XVI century, common bean seeds may have been carried from Brazil to Africa and Europe. It remains to be determined in future surveys if *R. tropici* is indeed present in non-disturbed areas of México, or if the isolate 655 resulted from an introduction in Mexico, carried by seeds.

Strains 657 and 660, isolated in Brazil, grouped with a bootstrap value of 100%, forming the subgroup II.2 of *R. tropici*. Unfortunately, as the data were not available at the GenBank, it was not possible to place the reference strain of *R. tropici* type A (CFN 299) on the concatenated tree. However, due to high similarity between CFN 299 and strains 657 and 660 in four housekeeping genes and in the 16S rRNA, we may infer that the strain should belong to the *R. tropici* A group. The predominance of this species in nodules of bean in Brazil has been broadly reported (Martinez-Romero 1991; Mercante et al., 1998; Hungria et al., 2000; Mostasso et al., 2002) and another important observation is the evolutionary distance between *R. tropici* type A and type B, who had been described previously (Martinez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 2000; Pinto et al., 2007; Ribeiro et al., 2009), denoting that they should represent two different species. Indeed, a new specie for *R. tropici* type A has been recently proposed (Ribeiro et al., submitted).

Finally, the third and possibly most interesting group (III) was also split in two subgroup (1 and 2), altogether joined with a bootstrap support of 100%, together with *R. radiobacter*, earlier named as *Agrobacterium* group (Young et al., 2001). Once more, two strains from Ecuador (673 and 675) were positioned closer to the type strain of *R. radiobacter* on subgroup III.2, while subgroup III.1 was formed by strains from México (662 and 665). Rhizobia resembling agrobacteria have been previously reported isolated from nodules of soybean (Chen et al., 2000) and common bean (Mhamdi et al., 1999). Furthermore, transfer of the symbiotic plasmid from *Rhizobium* to *Agrobacterium* under laboratory conditions has proven that the last one acquired the capacity of nodulation and fixing nitrogen (Martinez-Romero et al., 1987; Novikova and Safronova, 1992).

Despite being positioned in the same great group, strains from Mexico and Ecuador were phylogenetically distant from *R. radiobacter* and thus might represent a new species. Our study raised the need of a deeper analysis of the phylogeny or the symbiotic plasmid to clarify the evolution of these strains, and are now in course in our laboratory.

In conclusion, our study has clarified the phylogenetic position of some common bean rhizobial species, but has also raised other points to be studied. The MLSA has confirmed that *R. leguminosarum* and *R. etli* are different species, a subject that was not clear by the analysis of the 16S rRNA. However, the observation that *R. leguminosarum* might have originated in the Americas has been strengthened. The clear subdivision of *R. tropici* in two species has been confirmed. Finally, a group of strains capable of fixing nitrogen and resembling agrobacteria has been identified and deserve further studies, as they might

contribute to our knowledge about the boundaries between the symbiosis and pathogenicity processes.

References

- ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, 178, 161-164, 2002
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, v.161, p.147-156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 996–1006, 1997.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4025-4034, 2002.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4016-4021, 1995.
- BERNAL, G.; GRAHAM, P.H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.526–534, 2001.
- CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. A.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5099-5103, 2005.
- DEBOUCK, D. G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers? **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.67, p.2-8, 1986.
- EARDLY, B. D.; WANG, F. S.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.507-512, 1995.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants. Madison, **University of Wisconsin Press**, p.343, 1932.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2037-2048, 2001.

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

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. **Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**, In: A. van Schoonhoven, O. Voysest (Eds.), *Common Beans: Research for Crop Improvement*, CAB, Wallingford-UK, Cali-Colombia, p. 7-53, 1991.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three 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.

GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANDAMME, P.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE VOS, P. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.361, p.1911-1916, 2006.

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; FREIRE, J. R. J.; SÁ, E. L. S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.593-598, 2007.

GOGARTEN, J. P.; TOWNSEND, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.679-687, 2005.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198–207, 1994.

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

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.

HAN, T. X.; WANG, E. T.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; GU, J. G.; GU, C. T.; TIAN, C. F.; CHEN, W. X. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species

native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v.58, p.1693-1699, 2008.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBENZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.1515–1528, 2000.

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

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

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

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

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

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

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied and Soil Ecology**, v.32, p.210-220, 2006.

KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

KIPE-NOLT, J. A.; MONTEALEGRE M.; TOHME, J. Restriction of nodulation by the broad host range *Rhizobium tropici* strain CIAT899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. **New Phytologist**, v.120, p.489–494, 1992.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

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

MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUNI, M. E.; GHIR, R.; MARS, M. Genotypic Diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.313-320, 1999.

- 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.
- 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.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.11-23, 2003.
- MARTÍNEZ, E.; PALÁCIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.2828-2834, 1987.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.
- 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.
- MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JUNIOR, W. Q., VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian —cerrado || region. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.49-58, 1998.
- MONTEALEGRE, C.; GRAHAM, P. H.; KIPE-NOLT, J. A. Preference in the nodulation of *Phaseolus vulgaris* cultivar RAB39. **Canada journal of Microbiology**, v.41, p.992-998, 1995.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.
- NOVIKOVA, N. Y.; SAFRONOVA, V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring sym genes of *R. galegae* can form an effective symbiosis with *medicago sativa*. **FEMS Microbiology Letter**. V.93, p.262-268, 1992.
- PINTO, F. G. S.; CHUEIRE, L. M. O.; VASCONCELOS, A. T. R.; NICOLÁS, M. F. ALMEIDA, L. G. P.; SOUZA, R. C.; MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Novel genes related to nodulation, secretion system, and surface structures

revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. **Functional & Integrative Genomics**, v.9, p.263-270, 2009.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1851-1864, 2007.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.541-554, 2004.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* 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**, 2, 51-69, 2009.

RODIÑO, A. P.; SANTALLA, M.; DE RON, A. M.; DREVON, J.J. Co-evolution and Migration of Bean and Rhizobia in Europe. **Sustainable Agriculture Review**, v.3, p.171-188, 2010.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolutionary**, v.4, p.406-425, 1987

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

SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1260-1268, 1994.

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

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYŻAŃSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and south Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7041-7052, 2005.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1-9, 2008.

- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; RUMJANEK, N. G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p. 3-11, 1999.
- SULLIVAN, J. T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2818–2825, 1996.
- TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.349-356, 1998.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleotides Acids Research**, v.25, p.4876-4882. 1997.
- VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.
- VAN BERKUM, P., TEREFEWOR, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, M. K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.2988–2998, 2003.
- VELAZQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v.72, p.373-382, 1992.
- VINCENT, J. M. Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria, Blackwell Scientific, Oxford, UK (IBP Handbook No. 15), 1970.
- VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.702–716, 2005.
- WANG, E. T.; VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; DORADO, O.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium hautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacae* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.687-699, 1998.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.
- YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an amended 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. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Biological Fixation. STACEY, G., BURRIS, H. R. & EVANS, H., J. (Eds). Chapman and Hall, New York, p. 43-79, 1992.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.2271-2277, 1991.

Table 1 – *Rhizobium* strains of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) used in this study.

CNPSo	Synonymous	Geographic origin
655	UMR 1239, CP 32	México
657	UMR 1265	Brazil
659	UMR 1271,023-85EF	México
660	UMR 1283	Brazil
661	UMR 1286, Z31-4	México
662	UMR 1287, Z113-10	México
664	UMR 1298, Z147-15	México
665	UMR 1315, Z78A-6	México
666	UMR 1317, Z95B-8	México
671	UMR 1450	Pimampiro/Imbaburra/Equador
672	UMR 1452	La Olivos/Imbaburra/Equador
673	UMR 1454	Chaltura/Imbaburra/Equador
675	UMR 1457	Pallatanga/Chimborazo/Equador
679	UMR 1471	Chuquipata/Azuay/Equador
683	UMR 1490	Salapa/Loja/Equador

Table 2 – Genes and primers useds for the PCR amplification and sequencing analysis

Size of gene (≈bp)	Primer	Sequence (5' - 3')	Amplicon (bp)*	References
16S rRNA (1,500)	fd1	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	~1,500 pb (fD1-rD1)	Weisburg et al. (1991)
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		Young et al. (1991)
	362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG		Menna et al. (2006)
	786f	CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGG		Menna et al. (2006)
	rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC		Weisburg et al. (1991)
<i>recA</i> (1,090)	recA6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	~550	Gaunt et al. (2001)
	recA555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT		
<i>gyrB</i> (2,400)	gyrB343F	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	~650	Martens et al. (2008)
	gyrB1043R	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG		
<i>gltA</i> (1,290)	gltA428F	CSGCCTTCTAYCAYGACTC	~650	Martens et al. (2007)
	gltA1111R	GGGAGCCSAKCGCCTCAG		
<i>glnII</i> (1,040)	TSglnII _f	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	~589	Stepkowski et al. (2005)
	TSglnII _r	SGAGCCGTTCCAGTCGGGTGTCG		
<i>rpoA</i> (1,010)	RRrpoAf	GGAAATCGCCATCAAGATGG	~637	Ribeiro et al. (2009)
	RRrpoAr	ACGCTTGGCGAGATCTTC		

Table 3 – Morpho-physiological properties of *Rhizobium* strains of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) used in this study.

CNPSO	SYNONIMOUS	GROWTH	pH	FORM	ELEVATION	BORDERS	SURFACE	MUCO PRODUCTION	CONSISTENCY	OPTICAL DETAILS	CHROMO IN:		DIAM (mm)	
											BROMOTHYMOBLBLUE	RED CONGO	INITIAL (3 days)	FINAL (5 days)
655	UMR 1239, CP 32	Fast	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Gummy	Translucent	Yellow	Rose colored	2	5
657	UMR 1285	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Rose colored	1	3
659	UMR 1271,023-85EF	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	2	5
660	UMR 1283	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	2
661	UMR 1286, Z31-4	Fast	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	2	6
662	UMR 1287, Z113-10	Fast	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Watery	Translucent	Yellow	Red colored	1	4
664	UMR 1298, Z147-15	Fast	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	4
665	UMR 1315, Z78A-6	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Watery	Translucent	Yellow	Red colored	1	4
666	UMR 1317, Z95B-8	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	5
671	UMR 1450	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	5
672	UMR 1452	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	2	4
673	UMR 1454	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	4
675	UMR 1457	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Watery	Translucent	Yellow	Rose colored	1	4
679	UMR 1471	Intermediate	Acid	circular	Convex	Smooth	Smooth	Medium	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	1	3
683	UMR 1490	Intermediate	Acid	Circular	Convex	Smooth	Smooth	Abundant	Gummy	Opaque	Yellow	Red colored	2	5

Table 4 – Additional sequence information

Locus	Strains analysed (n)	Nucleotides (%)			
		Conserved	Variable	Parsimony-informative	Total*
16S rRNA	34	981 (77,9)	262 (20,8)	185 (14,7)	1258
<i>glnII</i>	28	161 (30,1)	352 (65,9)	152 (28,4)	534
<i>gltA</i>	28	214 (53,7)	181 (45,4)	118 (29,6)	398
<i>gyrB</i>	26	263 (39,7)	395 (59,7)	284 (42,9)	661
<i>recA</i>	34	245 (51,5)	228 (48,0)	177 (37,2)	475
<i>rpoA</i>	28	228 (53,6)	189 (44,4)	123 (28,9)	425
Concatenated genes	26	1142 (45,8)	1310 (52,5)	801 (32,1)	2493

Table 5 – GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences obtained in this study

Strain	16S rRNA	<i>glnII</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>
655	JN129372	JN129297	JN129312	JN129327	JN129342	JN129357
657	JN129373	JN129298	JN129313	JN129328	JN129343	JN129358
659	JN129374	JN129299	JN129314	JN129329	JN129344	JN129359
660	JN129375	JN129300	JN129315	JN129330	JN129345	JN129360
661	JN129376	JN129301	JN129316	JN129331	JN129346	JN129361
662	JN129377	JN129302	JN129317	JN129332	JN129347	JN129362
664	JN129378	JN129303	JN129318	JN129333	JN129348	JN129363
665	JN129379	JN129304	JN129319	JN129334	JN129349	JN129364
666	JN129380	JN129305	JN129320	JN129335	JN129350	JN129365
671	JN129381	JN129306	JN129321	JN129336	JN129351	JN129366
672	JN129382	JN129307	JN129322	JN129337	JN129352	JN129367
673	JN129383	JN129308	JN129323	JN129338	JN129353	JN129368
675	JN129384	JN129309	JN129324	JN129339	JN129354	JN129369
679	JN129385	JN129310	JN129325	JN129340	JN129355	JN129370
683	JN129386	JN129311	JN129326	JN129341	JN129356	JN129371

Figure legends:

- Fig. 1** –Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence of *Rhizobium* strains from this study and type/reference strains of common bean rhizobia and other related taxa. *Caulobacter crescentus* was used as an outgroup strain. The tree was generated using MEGA version 4.0.2 with default parameters, K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm. The percentage of replicate trees in which the associated strains clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches.
- Fig. 2** –Phylogenetic tree based on the *glnII*, *gltA*, *gyrB*, *recA* and *rpoA* sequences of *Rhizobium* strains from this study and type/reference strains of common bean rhizobia and other related taxa. *Caulobacter crescentus* was used as an outgroup strain. The tree was generated using MEGA version 4.0.2 with default parameters, K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm. The percentage of replicate trees in which the associated strains clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches.
- Fig. 3** –Phylogenetic tree of the concatenated genes *glnII* + *gltA* + *gyrB* + *recA* + *rpoA* of *Rhizobium* strains from this study and type/reference strains of common bean rhizobia and other related taxa. *Caulobacter crescentus* was used as an outgroup strain. The tree was generated using MEGA version 4.0.2 with default parameters, K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm. The percentage of replicate trees in which the associated strains clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches.

Fig. 1

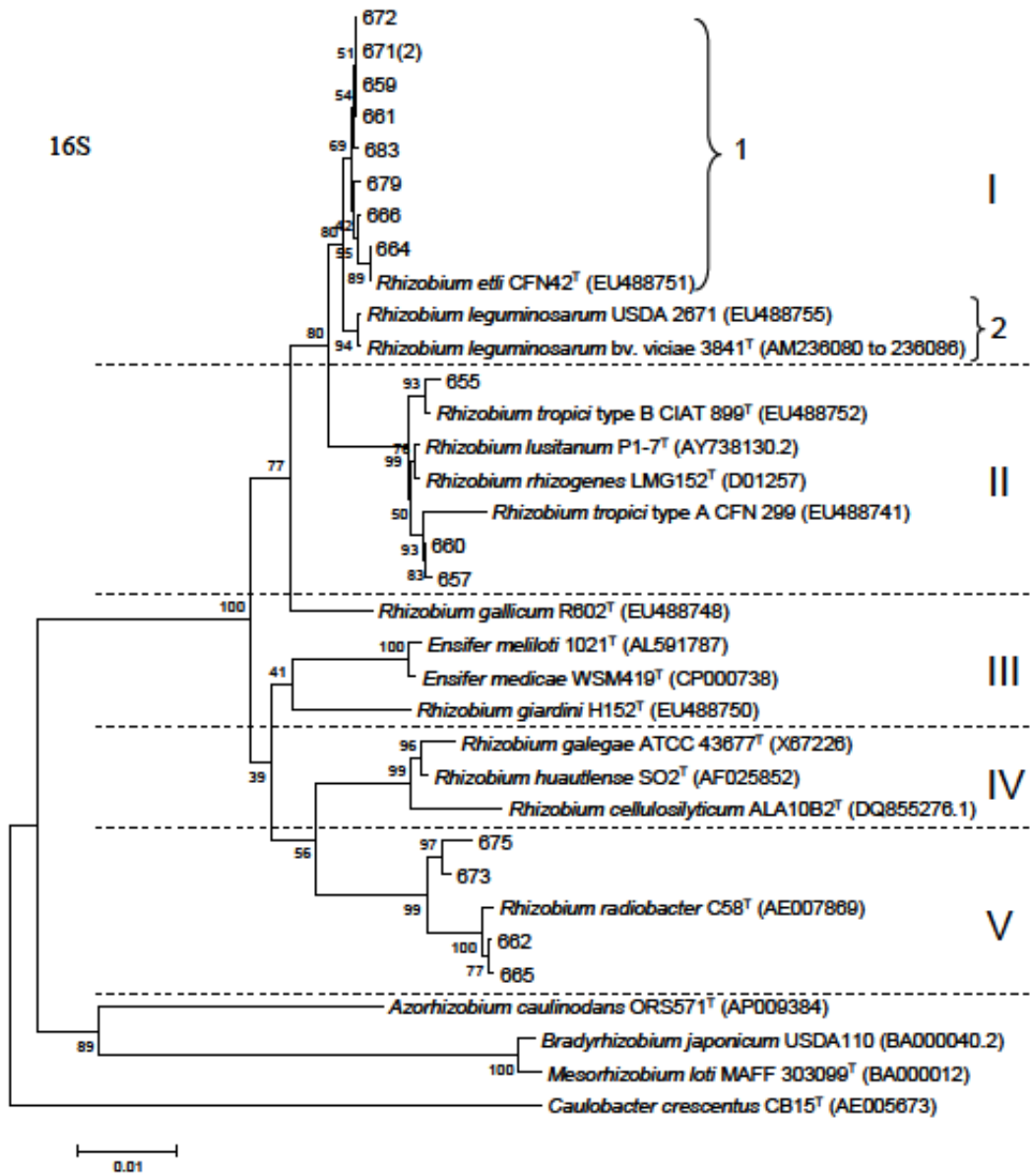
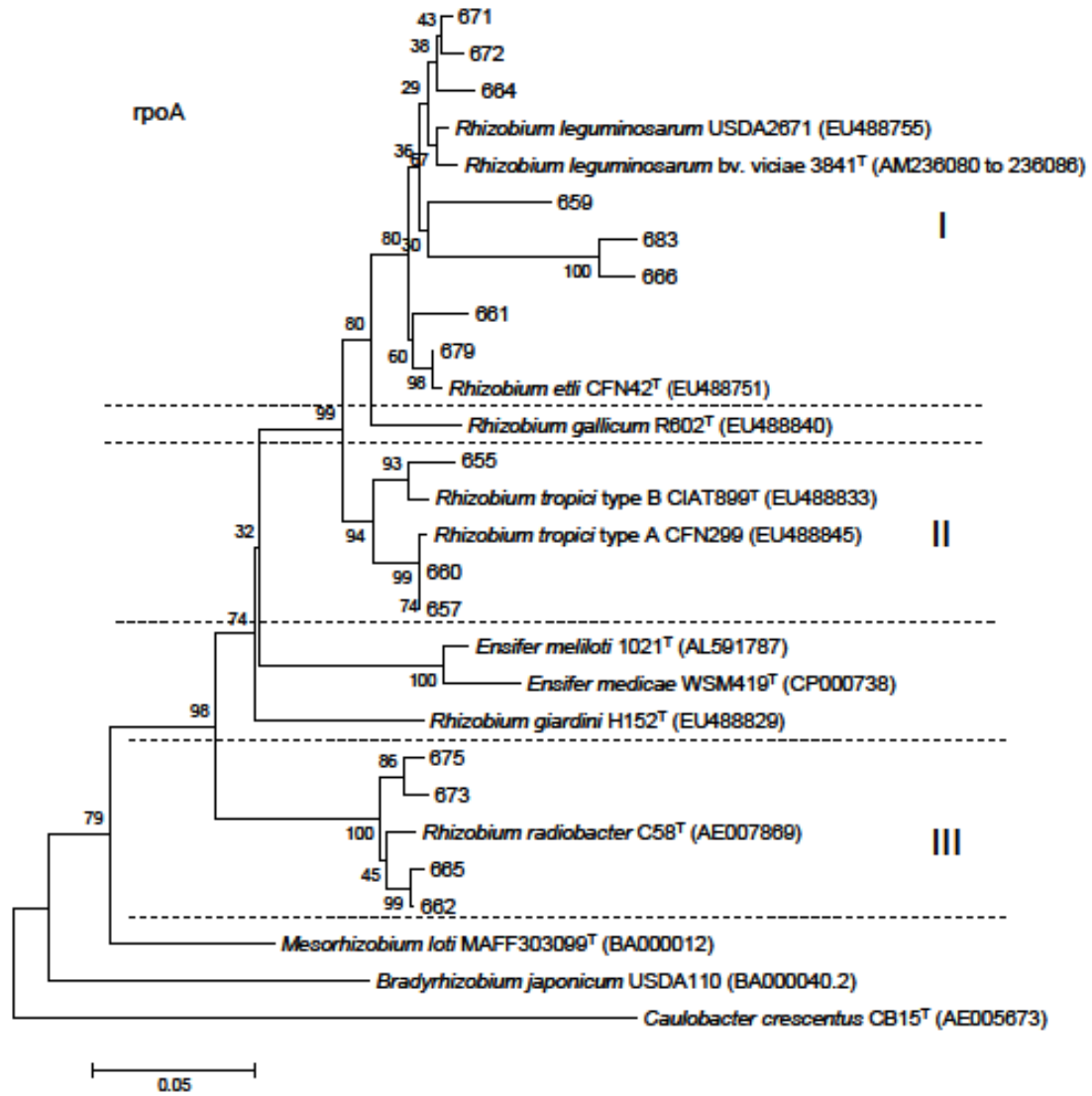
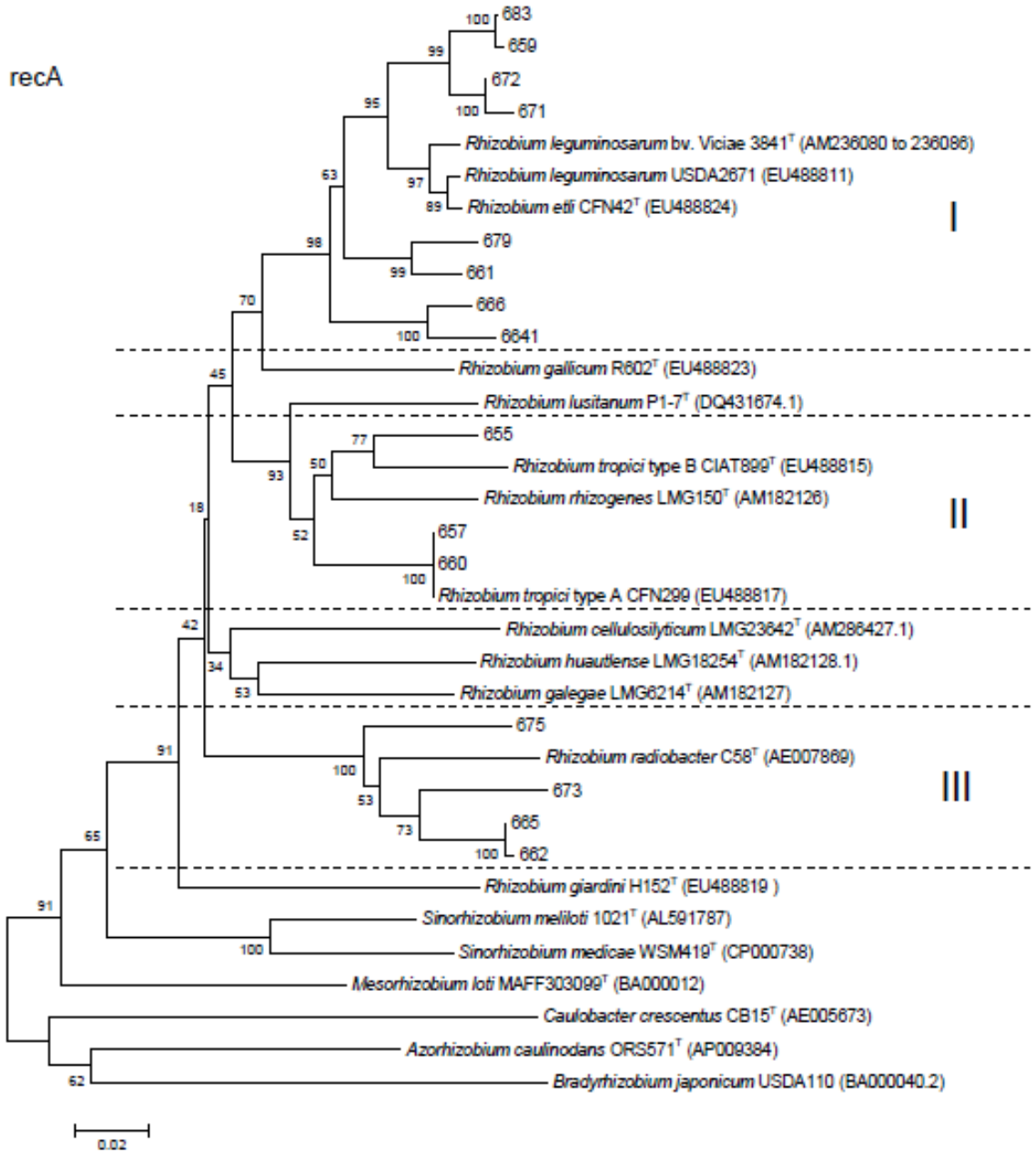
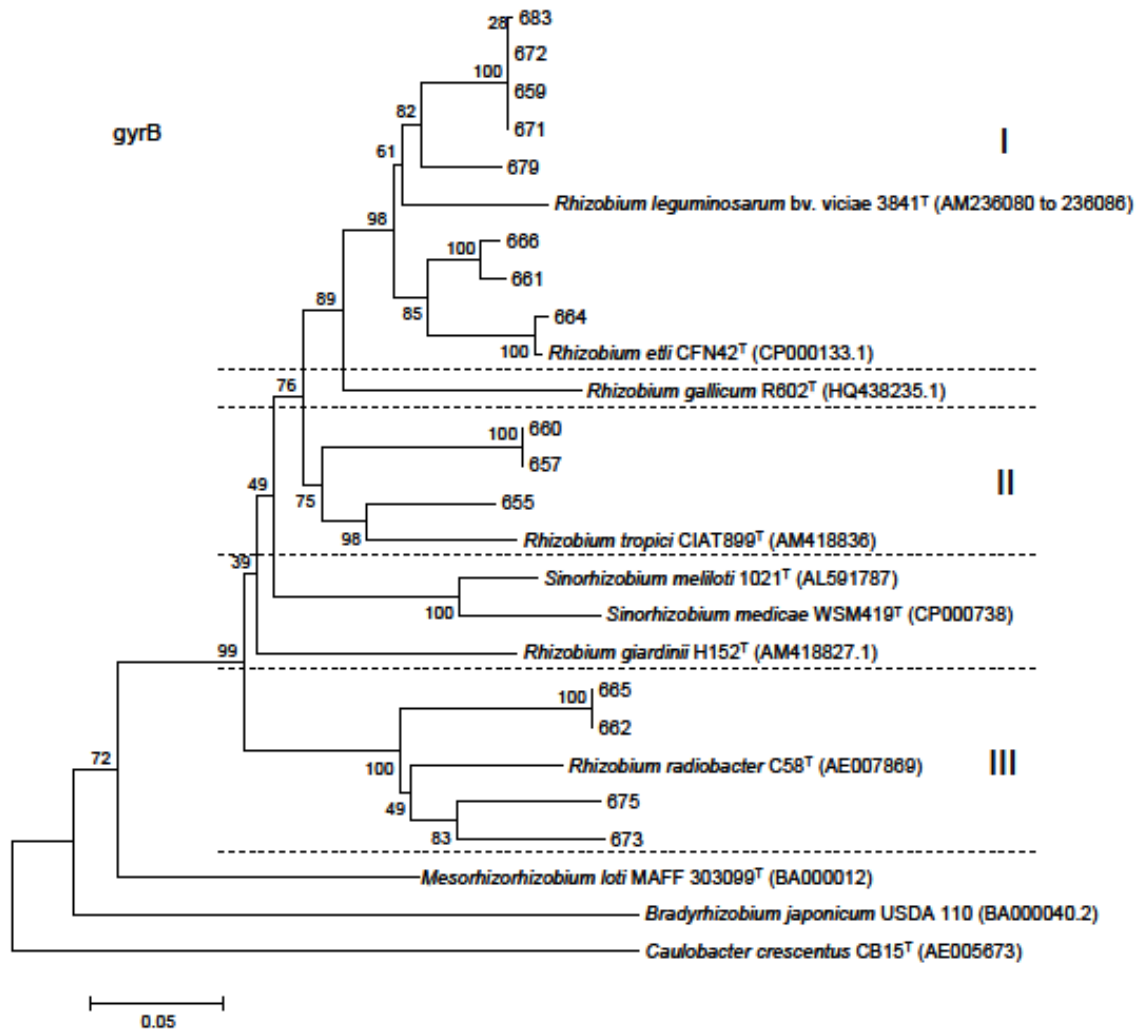
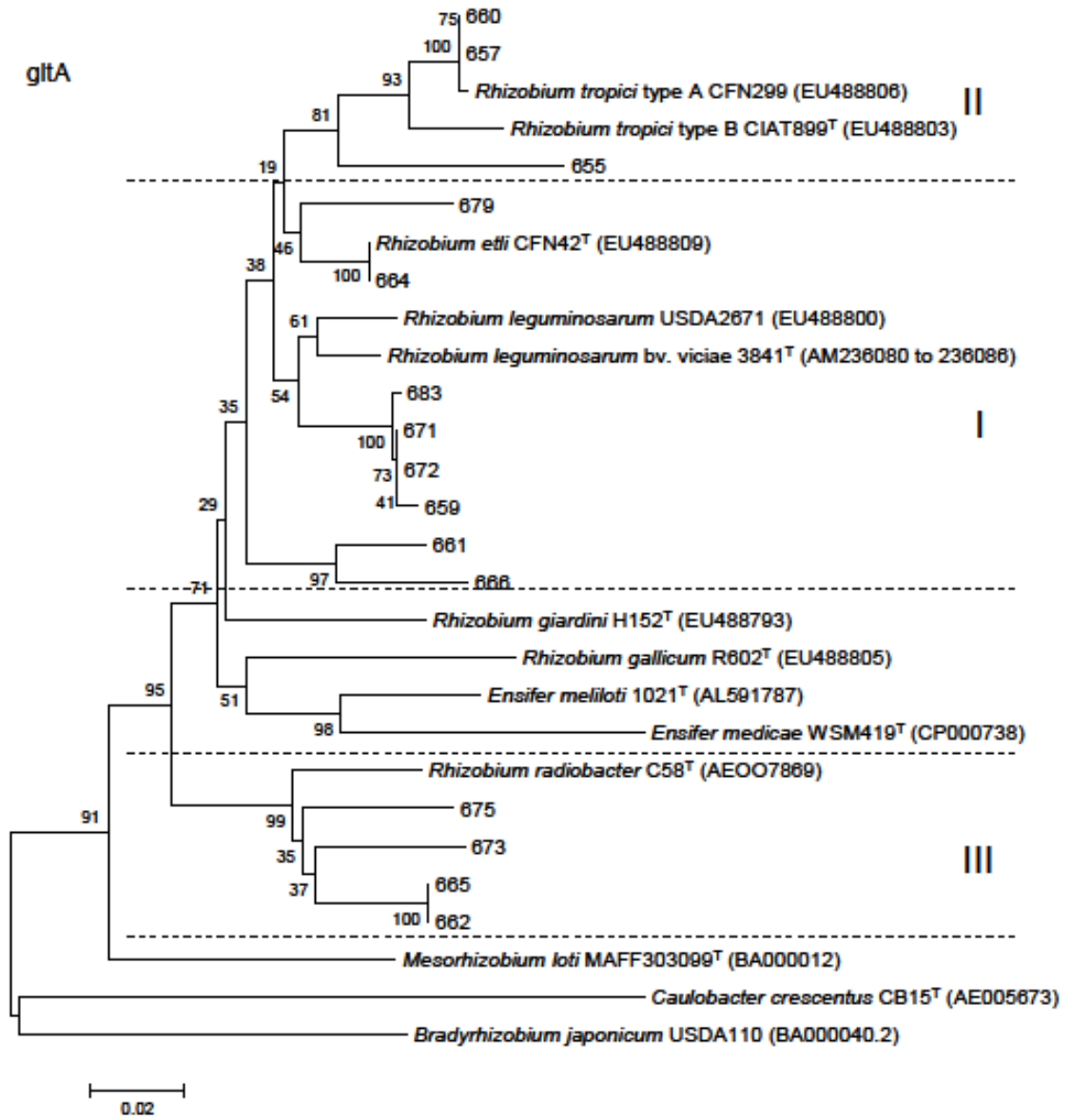


Fig. 2









glnII

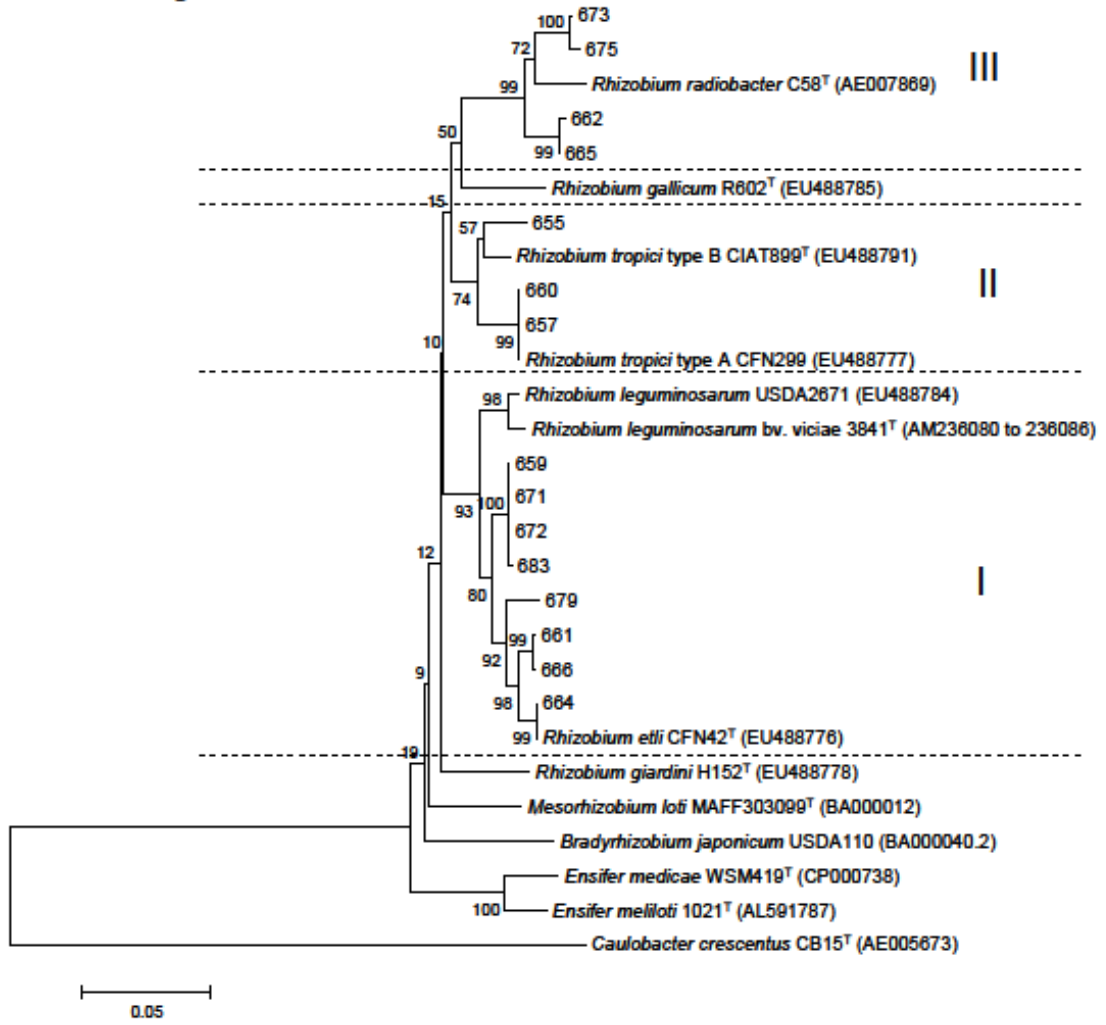
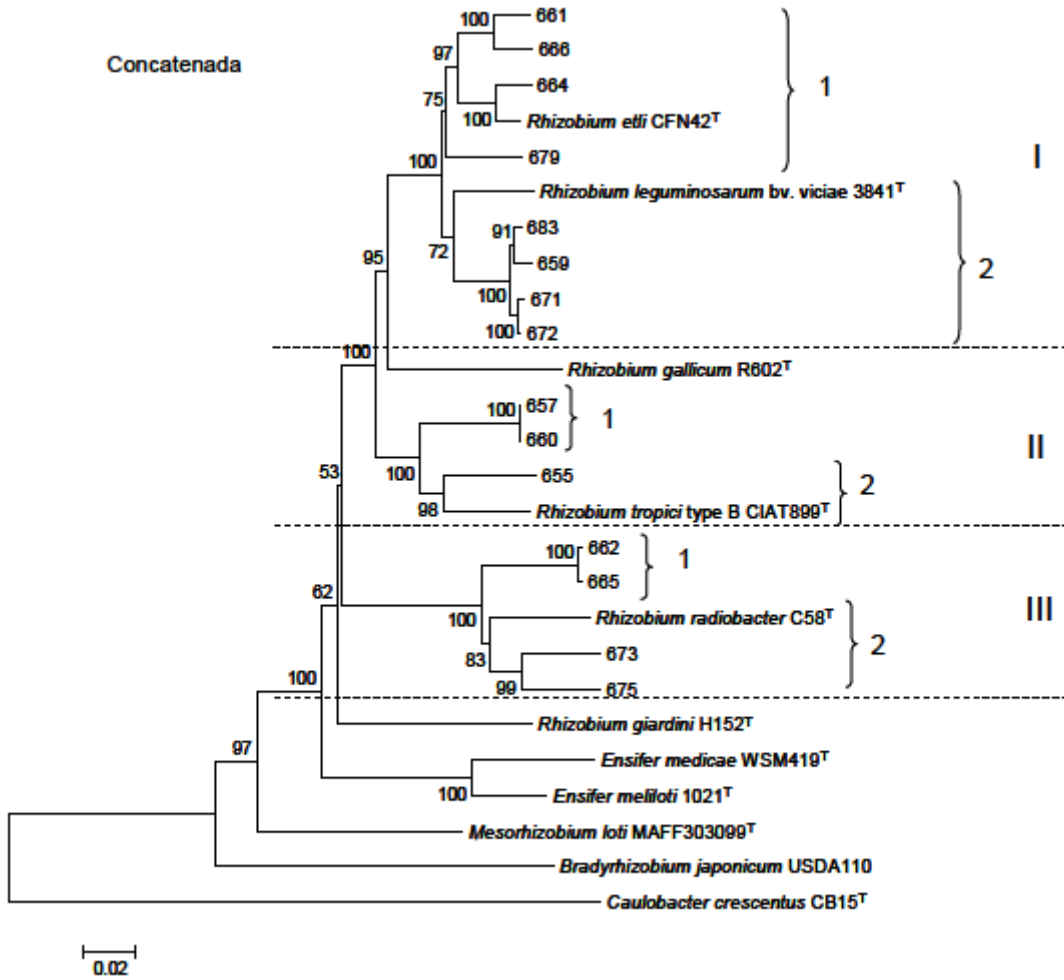


Fig. 3



6 CONCLUSÃO GERAL

Através da técnica de MLSA foi possível estabelecer as relações filogenéticas e taxonômicas, dentro de um grupo de rizóbios, demonstrando ser uma metodologia mais simples e confiável, comparada com a utilização de apenas um gene como marcador filogenético, mesmo quando forem analisados grupos taxonômicos muito relacionados. No primeiro trabalho podemos concluir, através dos resultados obtidos pela taxonomia polifásica, que *R. leucaenae* realmente representa uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium*. Os resultados do segundo trabalho definiram a verdadeira posição filogenética das estirpes utilizadas e demonstraram que mais estudos precisam ser realizados para estabelecer corretamente a origem geográfica e a rota de migração das espécies de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, principalmente de *R. leguminosarum*.