

Artigo original

FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS DO GÊNERO *Burkholderia* COM BASE NO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S Rrna

MOLECULAR PHYLOGENY OF RHIZOBIA OF THE GENUS Burkholderia BASED ON SEQUENCING GENE 16S rRNA

Antônio Francisco de Sousa¹, Rodrigo Maranguape da Cunha²

RESUMO

As bactérias do gênero *Burkholderia* em geral possuem importância agronômica e biotecnológica por atuarem como β -rizóbios realizando a fixação biológica do nitrogênio em simbiose com leguminosas. Recentemente o agronegócio brasileiro vem empregando β -rizóbios do gênero *Burkholderia* como biofertilizantes. Neste contexto, o desenvolvimento de trabalhos que forneçam a identificação, classificação e filogenia de isolados de rizóbios são de grande importância para a consolidação da biotecnologia dos rizóbios como inoculantes em leguminosas. Objetivou-se com este trabalho realizar a identificação e filogenia molecular de 15 isolados de uma coleção de β -rizóbios do gênero *Burkholderia* oriundos de raízes de leguminosas do gênero *Mimosa*, com base no sequenciamento e análise do gene 16S rRNA. Para esta finalidade, as sequências dos genes 16S rRNA foram amplificadas por PCR a partir de amostras de DNA dos isolados, sendo então sequenciadas e identificadas no GenBank do NCBI. Em seguida a filogenia molecular foi inferida por meio de reconstruções de árvores filogenéticas empregando o método Neighbour-Joining. Os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA mostraram que todos os isolados apresentaram sequências com similaridades de 99% e 100% com espécies de *Burkholderia* capazes de realizarem a fixação biológica do nitrogênio em associação simbiótica com leguminosas. A reconstrução da árvore filogenética agrupou os isolados em 7 grupos semelhantes revelando as relações de parentesco com espécies de *Burkholderia* diazotróficas simbióticas. Conclui-se, que a identificação bem como a homologia destes isolados com β -rizóbios do gênero *Burkholderia*, sugere o emprego destas bactérias no agronegócio como biofertilizantes.

Palavras-chave: Sequenciamento genético. Fixação biológica do nitrogênio. Biofertilizante. Bactérias do solo.

ABSTRACT

Bacteria of the genus Burkholderia in general have agronomic and biotechnological importance for acting like β -rhizobia realizing the biological fixation of the nitrogen in symbiosis with leguminous plants. Recently the Brazilian agribusiness has been using β -rhizobia of the genus Burkholderia as biofertilizers. In this context, the development of works that provide the identification, classification and phylogeny of rhizobia isolates are of great importance for the consolidation of the biotechnology of rhizobia as inoculants in legumes. The objective of this work was to identify and molecular phylogeny of 15 isolates from a collection of rhizobia of the genus Burkholderia from legume roots of the genus Mimosa, based on the sequencing and analysis of the 16S rRNA gene. To this end, the 16S rRNA gene sequences were amplified by PCR from the DNA samples of the isolates, and then sequenced and identified in the NCBI GenBank. Molecular phylogeny was then inferred through phylogenetic tree reconstruction using the following method Neighbor-Joining. The results of the 16S rRNA gene sequencing show that all the isolates present sequences

¹ Biólogo pela Universidade Estadual Vale do Acaraú e Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará. Sobral, CE. E-mail: francisco-bio@hotmail.com

² Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará. Docente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Vale do Acaraú. Sobral, CE. E-mail: rmaranguape@gmail.com

with similarities of 99% and 100% with *Burkholderia* species capable of performing the biological fixation of nitrogen in symbiotic association with legumes. Phylogenetic tree reconstruction grouped the isolates into 7 similar groups revealing kinship relationships with symbiotic diazotrophic *Burkholderia* species. It is concluded that the identification and homology of these isolates with β -rhizobia of the genus *Burkholderia* suggests the use of these bacteria in agribusiness as biofertilizers.

Keywords: Gene sequencing. Biological Nitrogen fixation. Biofertilizer. Soil bacteria.

INTRODUÇÃO

A agricultura moderna desempenha um papel significativo no atendimento às demandas de alimentos das populações humanas, mas também leva a uma crescente dependência de fertilizantes químicos e pesticidas, que podem provocar a poluição do meio ambiente. Em vista disso, o emprego de meios alternativos de fertilização do solo podem melhorar o manejo das culturas e preservar a natureza (BHARDWAJ et al., 2014). A agricultura orgânica com os biofertilizantes são uma dessas estratégias que não só garante a segurança alimentar, mas também contribui para a biodiversidade do solo. As vantagens adicionais dos biofertilizantes incluem uma maior vida útil, não causando efeitos adversos ao ecossistema (MEGALL; GLAUSER; RASMANN, 2014).

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é uma excelente alternativa natural de adubação nitrogenada no cultivo de leguminosas de importância comercial, como a soja (*Glycine max L.*), o feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) e o amendoim (*Arachis hypogaea L.*). Em comparação com o emprego de fertilizantes nitrogenados, estes apresentam um custo muito mais elevado além de ser uma fonte de poluição ambiental, uma vez que a produção de 1 kg desse fertilizante corresponde a 4,5 kg de CO₂ emitido na atmosfera, além disso, vale ressaltar que as plantas são pouco eficientes na absorção desses fertilizantes (OLIVEIRA et al., 2014).

Mendonça et al. (2017) afirmam que a inoculação de rizóbios em algumas leguminosas de importância agrônômica, dispensa a aplicação de adubos nitrogenados nos solos, tendo como resultado a redução do custo de produção. Entretanto, antes de se utilizar uma estirpe de bactéria como rizóbio comercial, é necessário uma série de estudos no tocante a avaliação de sua capacidade em estabelecer simbiose, seu potencial em fixar nitrogênio em associação com a leguminosa de interesse e, sobretudo sua classificação taxonômica e relações evolutivas.

Até o ano de 2001 acreditava-se que todos os rizóbios pertenciam à classe das α -proteobactérias, contudo, por meio da análise do gene 16S rRNA, novas reclassificações foram criadas, de maneira que membros da classe das β -proteobactérias também foram encontrados em nódulos de leguminosas, como é o caso do gênero *Burkholderia*, desde então designado de β -rizóbio (ZHENG et al., 2017).

Em taxonomia bacteriana, especial atenção tem sido dado a análise da sequência do gene 16S rRNA, haja visto que são genes extremamente antigos, conservados e presentes entre os procariotos (KIM

et al., 2014). Estas características tornam este gene um indicador de como as bactérias estiveram relacionadas durante a evolução, o que permiti atualmente que a classificação bacteriana seja realizada com base na análise do gene 16S rRNA (MAILHE et al., 2017).

Neste contexto o desenvolvimento de trabalhos que forneçam a identificação, classificação e filogenia de isolados de rizóbios são de grande importância para o desenvolvimento da biotecnologia dos rizóbios como biofertilizantes. Sobre isso, o agronegócio brasileiro vem empregando β -rizóbios do gênero *Burkholderia* (BINDE et al., 2009; MENNA et al., 2006).

Um estudo recente descreveu a aplicação de espécies de *Burkholderia* no cultivo de leguminosas. Este estudo avaliou a relação e a eficiência simbiótica de 14 isolados de *Burkholderia* obtidos de nódulos das raízes de *Mimosa tenuiflora* com as espécies *Mimosa atropurpureum*, *Mimosa bimucronata* e *Mimosa foliolosa*. Os autores verificaram que todos os isolados estabeleceram simbiose com *Mimosa bimucronata* e 12 isolados desenvolveram nódulos nas raízes de *Mimosa foliolosa*. Destes, seis promoveram o crescimento em *Mimosa bimucronata* e sete apresentaram eficiência simbiótica em *Mimosa foliolosa* (ARAUJO; CARVALHO; MOREIRA, 2017).

Objetivou-se com este trabalho descrever as relações filogenéticas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, de 15 isolados de uma coleção de β -rizóbios do gênero *Burkholderia* oriundos de leguminosas do gênero *Mimosa* do cerrado brasileiro.

METODOLOGIA

Isolados utilizados e condições de cultivo

Os 15 isolados analisados pertencem a uma coleção de β -rizóbios do gênero *Burkholderia* do Dr. Sérgio Miana de Faria (pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, Brasil) estocadas a -80°C em meio TY líquido (yeast-tryptone) (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999). São designados: SMF006, SMF007, SMF008, SMF011, SMF010, SMF011, SMF042, SMF089, SMF090, SMF091, SMF093, SMF094, SMF096, SMF098, SMF101 e SMF102. Os isolados foram recuperados de ampolas contendo estas bactérias e crescidos em meio TY líquido na temperatura de 28°C .

Extração do DNA e amplificação por PCR do gene 16S rRNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de culturas crescidas em meio TY líquido durante o final da fase exponencial de crescimento (10^9 células/ml). Este procedimento foi realizado de acordo com Menna et al. (2006) com modificações. As bactérias foram cultivados em meio TY líquido, com incubação a 28°C por 48 horas. Da suspensão bacteriana, 2 mL foi recolhido em tubos e centrifugado a 6000 x

g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%). Descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 400 µL de TE 50/20 (50 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl e 10 mM EDTA, pH 8,0), sendo as amostras incubadas a 60 °C por 1 hora. Foram adicionados 60 µL de SDS (10%), seguido de incubação a 60 °C por 30 minutos. Foram acrescentados e misturados por inversão dos tubos, 1 volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguido por uma centrifugação por 15 minutos a 2500 x *g* a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi coletada para novos tubos com adição de 700 mM de NaCl e incubação a 40 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 15 minutos a 4 °C e recolhido o sobrenadante. Foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto frio, e, em seguida, incubadas a -20 °C *overnight*. Após centrifugação a 15.000 x *g* por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70%. A seguir o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). E as amostras foram preservadas a -20 °C.

A região do gene 16S rRNA de cada isolado foi amplificado com os iniciadores universais rD1: 5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3' e fD1: : 5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GC-3', conforme descrito por Menna et al. (2006). Para a reação de PCR utilizou uma mistura com volume final de 40 µL, constituída por 150ng de DNA molde, 0,2mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada iniciador; 1,5mM de MgCl₂; 0,2 U de *Taq* DNA polimerase, sendo a mistura de reação diluída com água destilada esterilizada para PCR (Milli-Q) em tampão apropriado para a enzima conforme concentração sugerida pelo fabricante.

A amplificação foi realizada em 46 ciclos usando, sendo cada ciclo consistindo de: 94°C de desnaturação por 3 min, anelamento a 60 °C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C a 8 min.

Sequenciamento do gene 16S rRNA, identificação e análise filogenética

Os produtos de PCR obtidos de cada estirpe (150 ng por reação) foram amplificados utilizando o kit DYEnamic® ET terminator kit (MegaBace™ AmershamBiosciences), e 5 pmol de cada iniciador. Para a obtenção da sequência completa do gene 16S rRNA, além dos iniciadores universais, foram utilizados os seguintes iniciadores intragênicos: Y2, 362f, 786f e 1203f (MENNA et al., 2006). Desta forma, para cada amostra analisada, realizou-se 6 reações distintas para cada um dos iniciadores. A PCR consistiu em 29 ciclos de: 95 °C de desnaturação por 20 s, anelamento a 50°C por 15 s e extensão a 60 °C por 1,5 min.

Após amplificação, os produtos foram purificados por meio da precipitação com acetato de amônio (7,5M) e etanol e, em seguida, procedeu-se ao sequenciamento em sistema de eletroforese capilar (MegaBACE750). Os parâmetros de eletroforese utilizados foram: 3 kV por 60 s de injeção e 9 kV por 120 min de corrida.

Os eletroferogramas oriundos do programa MegaBACE Sequece Analysis 4.0[®] foram analisados e reunidos em sequências consenso chamadas de *contigs* usando os programas *phred*, *phrap*, *consed*. Todas as sequências foram editadas para exclusão de bases com qualidade *Phred* inferior a 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), para assegurar uma maior confiabilidade nos resultados posteriores.

Para a identificação do isolados, as sequência de cada isolado foi comparada com outras sequências de gene 16S rRNA de espécie de *Burkholderia* depositadas no *GenBank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Para a análise de filogenia molecular, foi empregado o algoritmo de reconstrução filogenética *Neighbor-Joining*. O suporte dos ramos foi inferido por valores de *bootstrap* de 1000 reamostragens. As espécies *Ralstonia pickettii* (AY741342) e *Pandoraea apista* (AY268172.1) foram utilizadas como *outgroup*.

A árvore foi composta por meio de um alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas neste trabalho com sequências de gene 16S rRNA de estirpes tipo de espécies de *Burkholderia* depositadas do *GenBank*. O alinhamento foi realizado empregando o programa ClustalW processado no programa Análise Genética de Evolução Molecular MEGA 6.0[®] (TAMURA et al., 2013) com os seguintes parâmetros: *Pair-wise Alignment* (*Gap opening* 10.00, *Gap Extension* 0.10), *Multiple Alignment* (*Gap opening*10.00, *Gap Extension* 0.10).

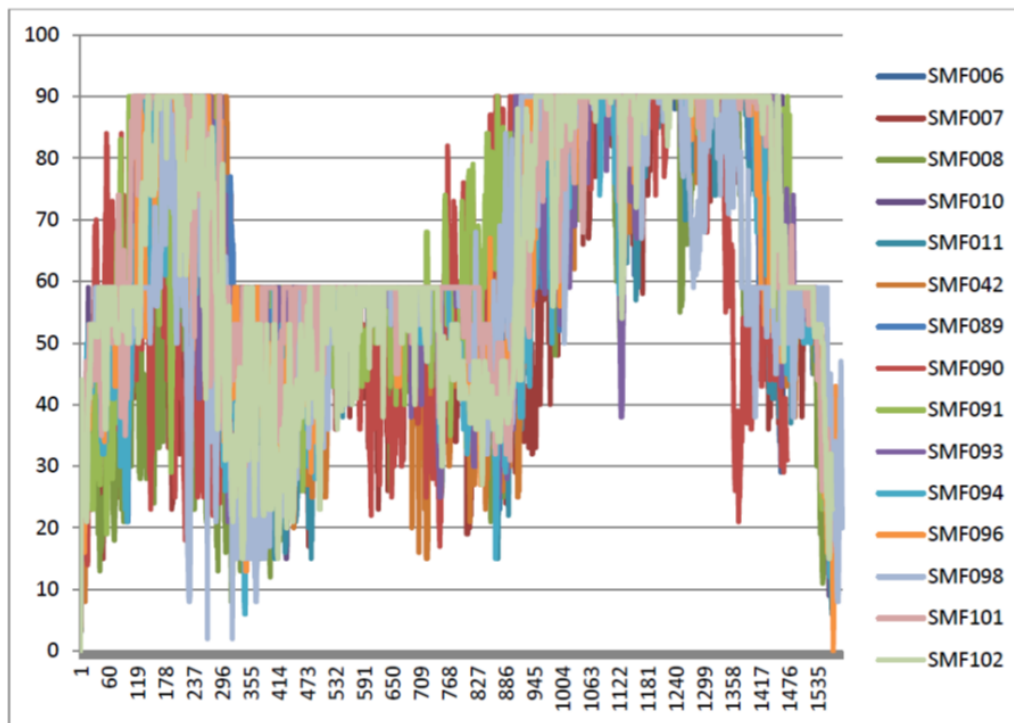
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequenciamento e análise da qualidade do gene 16S rRNA

Neste trabalho foi sequenciado o gene 16S rRNA de 15 isolados de *Burkholderia*, e foram obtidas sequências cujo comprimento variou entre 1471 a 1567 nucleotídeos (Tabela 1). Uma vez que este gene possui aproximadamente 1550 nucleotídeos afere-se que neste trabalho obtivemos sequências de tamanhos satisfatórios.

A figura 1 mostra as variações de qualidade do sequenciamento conforme as regiões da sequência. De acordo com este resultado, em todas elas, a qualidade foi menor nas extremidades, oscilou no meio do segmento e foi maior próximo a extremidade final, atingindo o nível 90. Sobre isso, vale ressaltar que o valor 90 (1 erro a cada 109 bases lidas) atribui grande confiabilidade aos resultados.

Figura 1– Verificação da qualidade da sequência do gene 16S rRNA conforme o segmento para cada um dos isolados de SMF. Sobral, CE. 2018.



Fonte: Própria Autoria.

Tabela 1 - Tamanho em pares de base (pb) das sequências obtidas de cada um dos isolados estudados neste trabalho. Sobral, CE. 2018.

Isolados	Tamanho das sequências (pb)
SMF006	1550 pb
SMF007	1551 pb
SMF008	1536 pb
SMF010	1540 pb
SMF011	1559 pb
SMF042	1551 pb
SMF089	1553 pb
SMF090	1471 pb
SMF091	1553 pb
SMF093	1556 pb
SMF094	1557 pb
SMF096	1553 pb
SMF098	1567 pb
SMF101	1558 pb
SMF102	1556 pb

Fonte: Própria autoria

A comparação entre as sequências dos isolados com sequências depositadas no *GenBank* do obte-

ve os seguintes resultados expressos em porcentagem de similaridades: isolados SMF006 e SMF011: *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 (100% e 99%, respectivamente); isolados SMF007, SMF010 e SMF091: *Burkholderia* sp. CAF324 (99%); isolados SMF008 e SMF096: *Burkholderia nodosa* Br3437T (99%); isolado SMF042: *Burkholderia phymatum* STM815 (100%); isolados SMF089, SMF090, SMF094 e SMF101: *Burkholderia* sp. SEMIA 6413 (99%); isolados SMF093: *Burkholderia* sp. SEMIA 6398 (99%); isolado SMF098: *Burkholderia nodosa* Br3461 (99%) e isolado SMF102: *Burkholderia* sp. SWF66247.

Análise de filogenia molecular

A árvore filogenética reconstruída com as sequências dos genes 16S rRNA destas bactérias está apresentada na figuras 2. Os 15 isolados foram agrupados em 7 grupos filogenéticos. O grupo 1 inclui os isolados SMF006 e SMF011 com *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100, um β -rizóbio com capacidade biorremediadora, em um ramo bem suportado com *bootstrap* de 100%, indicando tratarem-se da mesma espécie.

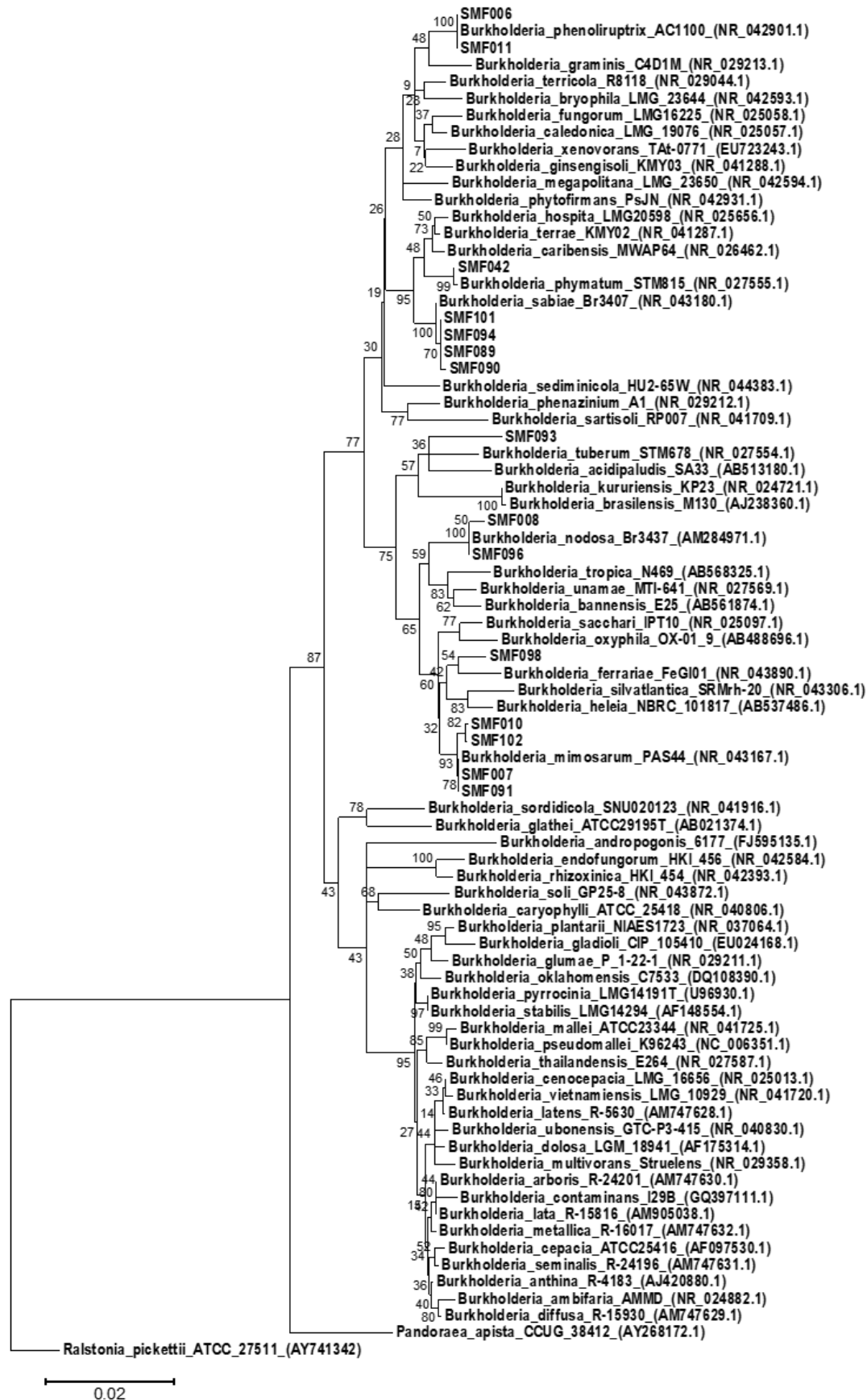
O grupo 2 relaciona o isolado SMF042 com *Burkholderia phymatum* STM815 em ramos bem suportados, com *bootstraps* de 99%. O grupo 3 inclui os isolados SMF089, SMF90, SMF094 e SMF101 com *Burkholderia sabiae* Br3407. Pelo método NJ a estirpe Br3407 esta relacionada com estes isolados em um ramo bem suportado com *bootstrap* de 100%. Assim, o método não atribui divergência genética entre os isolados, considerando-os como pertencentes a uma mesma espécie, relacionadas à Br3407.

O grupo 4 relaciona isolado SMF093 com *Burkholderia tuberum* STM678, no qual SMF093 faz parte de um grupo monofilético com as espécies *B. tuberum*, *B. acidipaludis* (bactéria de solo ácido), *B. kururiensis* (diazotrófica endofítica) e *B. brasilensis* (diazotrófica endofítica).

O grupo 5 inclui os isolados SMF008 e SMF096 com *Burkholderia nodosa* Br3437. Este grupo encontra-se em ramos bem suportados com *bootstrap* de 100%, considerando-os como mesma espécie.

O grupo 6 reuni o isolado SMF098 com *Burkholderia ferrariae* FeGI01, uma bactéria do solo. No grupo 7, foram agrupados os isolados SMF007, SMF010, SMF091 e SMF102 com *Burkholderia mimosarum* PAS44. Pelo método NJ, não há divergência entre os isolados SMF007 e SMF091, considerando-os, como mesma espécie.

Figura 2– Árvore filogenética utilizando o método de *Neighbor-Joining*. Sobral, CE. 2018.



Fonte: Própria Autoria.

O emprego de espécies de *Burkholderia* vem sendo estudado no Brasil desde os anos 2000. Menna et al. (2006) ao realizarem a caracterização molecular com base no gene 16S rRNA de 68 estirpes da coleção SEMIA recomendadas para a cultura de 64 espécies de leguminosas, verificou que 7 são estirpes de *Burkholderia*, sendo elas: SEMIA 6398, SEMIA 6390, SEMIA 6394 agrupadas com *Burkholderia cepacia* SEMIA 6167, SEMIA 6382 (BR 3405), SEMIA 6166 e SEMIA 6412 agrupadas com *Burkholderia* sp. Neste trabalho os autores não observaram correlação entre as sequências dos gene 16S rRNA com os tipos de leguminosas que se associavam, indicando haver um alto nível de promiscuidade nas relações de simbiose rizóbio-hospedeiro.

Em seguida Binde et al. (2009) ao realizarem um estudo com 54 estirpes elite recomendadas como inoculantes para leguminosas no Brasil, verificaram por meio de análise do gene 16S rRNA, a ocorrência de mais 5 estirpes de *Burkholderia*, sendo elas: SEMIA 6417, SEMIA 6422, SEMIA 6385, SEMIA 6410 e SEMIA 6413.

O advento do emprego de *Burkholderia* spp como inoculante ampliam ainda mais a biotecnologia agrícola, inaugurado o uso de β -rizóbios como biofertilizantes. Sobre isso, vale destacar que estes rizóbios podem apresentar demais características que tornem sua utilização ainda mais atraente, por exemplo Talbi et al. (2013) relatam que *Burkholderia phymatum* apresenta sua atividade fixadora de nitrogênio em simbiose com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) tolerante ao estresse salino, indicando o potencial uso desta bactéria na melhoria da produção das culturas em solos de elevada salinidade.

No presente estudo todos os isolados foram relacionados com espécies de *Burkholderia* capazes de estabelecer associação simbiótica com espécies de leguminosas, realizando a fixação biológica de nitrogênio. Por meio da análise de filogenia molecular observou-se as relações evolutivas entre estes isolados e espécies de *Burkholderia* diazotróficas endofíticas. Estes achados indicam o possível emprego destes isolados na inoculação em leguminosas de importância agronômica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho obteve a descrição filogenética de uma coleção de β -rizóbios do gênero *Burkholderia* oriundos de leguminosas do gênero *Mimosa* do cerrado brasileiro. O sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados analisados revelam similaridades de 99% e 100% com espécies de *Burkholderia* diazotróficas simbióticas. Além disso, a árvore filogenética revelou as relações de parentesco entre as espécies de *Burkholderia*.

A identificação bem como a proximidade evolutiva dos isolados de SMF com β -rizóbios do gênero *Burkholderia*, sugerem o emprego destas bactérias no agronegócio como biofertilizantes.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CONCRETE INSTITUTE. *ACI 440R-96: State-of-the-Art Report on Fiber Reinforced Plastic (FRP) Reinforcement for Concrete Structures. USA, 2002.*

ARALDI, E. *Reforço de Pilares por encamisamento de concreto armado: eficiência de métodos de cálculo da capacidade resistente comparativamente a resultados experimentais. Trabalho de Diplomação Engenharia Civil – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.*

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6118: Projeto de estruturas de concreto - Procedimento. ABNT:Rio de Janeiro, 2014.*

CARRAZEDO, R. (2002). *Mecanismos de confinamento e suas implicações no reforço de pilares de concreto por encamisamento com compósito de fibras de carbono. São Carlos, 2002. 173p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.*

HABITZREUTER, L.; ROSS, H. L. S.; SANTOS, G. M. S. *Análise da eficiência do reforço estrutural com fibra de carbono em pilares curtos. 2013. 62. Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Engenharia de Produção Civil, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.*

MACHADO, A. de P. *Manual de reforço das estruturas de concreto armado com fibras de carbono. São Paulo: Better, 2011.*

REIS, L. S. N. *Sobre a recuperação e reforço das estruturas de concreto armado. Dissertação de Pós-Graduação em Engenharia de Estruturas, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2001.*
