



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ILMARA VAROTTO ROMA NETO

**TAXONOMIA E FILOGENIA, COM BASE NA ANÁLISE DOS
GENES RIBOSSOMAL 16S E *glnII*, DE 23 ESTIRPES
AUTORIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES
COMERCIAIS NO BRASIL PARA 21 ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS**

ILMARA VAROTTO ROMA NETO

**TAXONOMIA E FILOGENIA, COM BASE NA ANÁLISE DOS
GENES RIBOSSOMAL 16S E *glnII*, DE 23 ESTIRPES
AUTORIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES
COMERCIAIS NO BRASIL PARA 21 ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS**

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

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2009

ILMARA VAROTTO ROMA NETO

**TAXONOMIA E FILOGENIA, COM BASE NA ANÁLISE DOS
GENES RIBOSSOMAL 16S E *glnII*, DE 23 ESTIRPES
AUTORIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES
COMERCIAIS NO BRASIL PARA 21 ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA-CNPSO

Profa. Dra. Diva Souza Andrade
Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - CCB-UEL

Londrina, 25 de maio de 2009.

*Ao meu irmão Marcos Raphael
Ribeiro Tostes pelo amor incondicional,
mesmo estando tão distante...*

(IN MEMORIAN)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Mariangela, Fernando e Pamela, que me ajudaram para que fosse possível a realização desse trabalho, e que trabalho árduo né... Obrigada pela oportunidade e pela amizade, serei eternamente grata!

A Mariangela em especial não somente como orientadora, mas como ser humano, principalmente mãe, (apesar das nossas indas e vindas né chefe), te admiro muito, mais do que você possa imaginar.

A Ligia Chueire, por tudo, tudo mesmo! Pelos ensinamentos e principalmente pelas conversas tão sensatas e não sensatas que tivemos, vou levar para a vida toda.

A Providência Divina pela oportunidade de aprendizado.

A minha família, em especial minha mãe, avó e Adriano, pela compreensão e sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao meu "tio Vazico" que foi meu pai por todos esses anos e que sempre me ajudou, o qual nós acreditamos que era imortal, onde você estiver tio... EU TE AMO.

Aos meus filhos, que em todos os momentos estavam ao meu lado, com um amor gratuito, puro e lindo, que me acolhe nos momentos mais difíceis. Filhos iguais não existem nesse mundo inteiro. OBRIGADA MEU DEUS...

Ao meu irmão Raphael, que faz muita falta, mas não deixa de estar um só minuto em meu coração, e que sinto a presença constante ao meu lado...

As pessoas que me concederam moradia, meus primos, Glaciela e Odair e D. Lourdes muito obrigada, já pensou eu morando embaixo da ponte...

A Luciana chorosa Ruano... (brincadeira!), obrigada pela ajuda, por me ouvir, pelos conselhos e pela disposição, você mora no meu coração.

Aos todos amigos de laboratório, Letícia, Luciana (valeu Lú), Renan (valeu Rê), Pamela, Jesi, Maria, Adalgisa, Simone (valeu Si), Adriana, Elisete, Juscélio (valeu Ju), Renata, Aline, Gesiele, Susete chacrete, André, Leni, Dr Rubens, D. Rosa, Sueli, Rinaldo, Glaciela, Rafa e a todos que me ajudaram de uma forma direta ou indireta e acabaram se tornando minha segunda família, adoro todos vocês, obrigada pelas conversas, conversas e conversas, muita ajuda, ombro amigo, orações, ensinamentos, conselhos e risadas.

Aos professores da Pós-graduação em Microbiologia, em especial a professora Jacinta, pelo apoio e amizade.

A EMBRAPA soja pelo suporte para o desenvolvimento do trabalho e pela estrutura que me foi concedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“A não – violência nos leva à maior alta ética, a qual é o objetivo de toda a evolução”. Até pararmos de ferir outros seres vivos, seremos ainda selvagens...”

(Thomas A. Edison).

“Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca que prefere viver no mundo como está, ao invés de usar o poder que tem para mudá-lo.

Impossível não é um fato é uma opinião!

Impossível não é uma declaração é um desafio!

Impossível é hipotético!

Impossível é temporário!

Impossível é nada!”

Mohamed ALI

ROMA-NETO, ILMARA VAROTTO. **Taxonomia e filogenia, com base na análise dos genes ribossomal 16S e *glnII*, de 23 estirpes de rizóbios autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil para 21 espécies de leguminosas.** 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O nitrogênio é um nutriente extremamente importante para as plantas, por ser indispensável para a produção de muitos compostos essenciais e estar diretamente relacionado com a constituição de sua matéria orgânica. Visto que nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, existem algumas formas de fornecimento desse nutriente, dentre elas, o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), de grande importância econômica e agrônômica. A seleção, identificação e manutenção das estirpes elite de rizóbios para cada leguminosa hospedeira representam etapas críticas para o sucesso da FBN. Décadas de pesquisa no Brasil resultaram na identificação de várias estirpes que são oficialmente autorizadas para a produção de inoculantes para várias leguminosas; a caracterização genética dessas estirpes, porém, deu apenas os primeiros passos. O objetivo deste trabalho foi o de obter um melhor entendimento sobre as relações filogenéticas e o posicionamento taxonômico de 23 estirpes de rizóbios autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para 21 leguminosas. A caracterização genética teve como base, a análise de seqüências do gene ribossomal 16S e do gene *glnII*, que codifica a enzima glutamina sintetase II (EC 6.3.1.2), bem como desses dois genes concatenados. As estirpes foram isoladas de uma variedade de leguminosas, incluindo três subfamílias e 13 tribos. Nas árvores filogenéticas obtidas, foram observados, cinco grupos principais para o gene ribossomal 16S, cinco para o *glnII* e quatro para a árvore concatenada. De um modo geral, houve a formação de agrupamentos com as estirpes tipo de rizóbios em todas as árvores construídas. Algumas estirpes diferiram em mais 2% dos nucleotídeos do gene ribossomal 16S e mais de 3% para os genes concatenados em comparação com as estirpes tipo, forte indicativo de que podem representar novas espécies. As análises filogenéticas também demonstraram alta congruência entre as seqüências do gene ribossomal 16S e do gene *glnII*, e a definição dos grupos foi consideravelmente incrementada com a análise dos genes concatenados. Os resultados obtidos foram claros na proposta de que a seqüência do gene *glnII* representa uma ferramenta adicional valiosa para estudos de filogenia e taxonomia de rizóbios.

Palavras-chave: 16S RNAr. *GlnII*. Filogenia. Fixação biológica do nitrogênio. Rizóbios. Taxonomia.

ROMA-NETO, ILMARA VAROTTO. **Taxonomy and phylogeny, based on the analyses of the 16S ribosomal and *glnII* genes, of 23 rhizobial strains authorized for the production of commercial inoculants in Brazil for 21 legume plants.** 2009. 80p. Dissertation (Master`s Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Nitrogen is an extremely important nutrient for the plants, because it is essential for the production of several essential compounds and is also directly related to the formation of plant organic matter. No animal or plant is able to use nitrogen directly, therefore there are some ways by which the nutrient can be used, including the biological nitrogen fixation (BNF) process, of great economic and agronomic importance. The selection, identification and maintenance of elite rhizobial strains for each legume host represent critical steps for the success of the BNF process. Decades of research in Brazil resulted in the identification of several strains which are officially authorized for the production of inoculants for several legumes; however, the genetic characterization of those strains is only starting. The objective of this study was to obtain a better understanding about the phylogenetic relationships and the taxonomic position of 23 rhizobial strains authorized for the production of commercial inoculants for 21 legumes. The genetic characterization was based on the analyses of the sequences of the ribosomal 16S gene and of the *glnII* gene, which encodes for the enzyme glutamine synthetase (E.C. 6.3.1.2), as well as of the concatenated genes. The strains were isolated from a variety of legumes, including three subfamilies and 13 tribes. In the phylogenetic trees, five major groups were observed for the ribosomal 16S gene, five for the *glnII* and four for the concatenated tree. In general, clustering with type strains were observed in all trees. Some strains have shown differences of 2% of the nucleotides of the 16S ribosomal gene and more than 3% for the concatenated genes in comparison to the type strains, strongly suggesting that they might represent new species. The phylogenetic analyses have also indicated high congruence in the analysis of the ribosomal 16S and of the *glnII* genes, and the clustering definition was considerably improved when the concatenated genes were considered. The results obtained are clear in the proposal that the sequence of the *glnII* gene represents a valuable additional tool for studies of phylogeny and taxonomy of rhizobia.

Keywords: 16S rRNA. *glnII*. Phylogeny. Biological Nitrogen Fixation. Rhizobia. Taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Escala de tempo, demonstrando a origem e evolução dos rizóbios, a partir da seqüência dos genes parálogos *glnA* e *glnII*, e substituição de códons com troca de aminoácidos em genes ortólogos34
- Figura 2** – Filogenia da árvore baseada no gene ribossomal 16S, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. A árvore foi gerada usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”61
- Figura 3** – Filogenia da árvore baseada no gene *glnII*, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. A árvore foi gerada usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”62
- Figura 4** – Filogenia da árvore baseada no gene ribossomal 16S concatenado ao gene *glnII*, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. A árvore foi gerada usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”63

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Estirpes que foram utilizadas nesse estudo | 36 |
| Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos genes conservados “housekeeping” | 39 |
| Tabela 3 – Informação sobre as seqüências do 16S rRNA, <i>glnII</i> e as seqüências concatenadas das estirpes em estudo | 59 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS E RIZÓBIOS | 18 |
| 3.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO | 20 |
| 3.3 OS RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO | 22 |
| 3.4 TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA | 24 |
| 3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA NA ORDEM <i>Rhizobiales</i> | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 ESTIRPES UTILIZADOS | 36 |
| 4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO | 37 |
| 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL | 38 |
| 4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR | 39 |
| 4.5 REAÇÕES DE PCR PARA O SEQUÊNCIAMENTO | 40 |
| 4.6 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS | 41 |
| 4.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS | 41 |
| 5 RESULTADOS | 43 |
| 6 DISCUSSÃO | 51 |
| REFERÊNCIAS | 64 |

1 INTRODUÇÃO

As bactérias, individualmente, são muito pequenas para serem observadas, sendo assim, há a necessidade de algumas intervenções, como exemplo, o microscópio, o qual foi inventado por van Leewenhoek's em 1685 e que, além de tornar possível visualiza-lás, permitiu, também, classificá-las em grupos morfológicos, como cocos, espiral e diplococos (COHN, 1872; DE KRUIF, 1926).

Em 1884, Christian Gram separou as bactérias dentro de dois grandes grupos, as Gram positivas e as Gram negativas, com base em coloração diferencial frente a corantes (STARR; SCHIMIDT, 1981). Uma segunda era se iniciou com a identificação por características bioquímicas e fisiológicas, a partir de 1900 (ORLA-JENSEN, 1909). E, finalmente, uma terceira revolução aconteceu em 1970, quando Sanger, Gilbert e Maxam desenvolveram métodos para o seqüenciamento do DNA (BRENNER; MILLER, 2002; JANDA; ABBOT, 2002).

A classificação de organismos vivos foi um tema de grande interesse para os cientistas que pesquisavam a história natural na Europa a partir do século XVI. Lineu propôs um sistema binomial de classificação e que ainda representa uma das bases da classificação atual dos organismos. Em 1758, a décima edição do *Systema Naturae* de Lineu incluía 5.897 espécies de plantas e animais, os dois reinos nos quais ele dividiu os organismos vivos. A taxonomia se tornou uma ciência durante o século XIX, resultando em um rápido aumento no número de animais e plantas terrestres conhecidos (THOMPSON; OLIVEIRA, 2005).

O propósito primário de um sistema taxonômico utilitário é o de fornecer classificações que sejam úteis para finalidades científicas ou práticas diversas, especialmente para a identificação e, também, para gerar bases de dados contendo informações relevantes sobre organismos. Estas classificações devem ser estáveis, objetivas e preditivas. Os primeiros sistemas de classificação de procariotos eram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas, que eram usadas para agrupar linhagens, a despeito de qualquer afinidade evolutiva verdadeira e, por isso, foram tidos como artificiais (JORDAN, 1984).

Estes sistemas refletiam as limitações tecnológicas daquele período. Na prática, estes sistemas, baseados em algumas propriedades morfológicas e

comportamentais, levaram a sérios erros de classificação microbiana em variados grupos de bactérias (BOONE; CASTENHOLZ, 2001).

Tais métodos microbiológicos tradicionais, baseados em características fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informações descritivas para a estruturação de diversos taxa bacterianos (THOMPSON; OLIVEIRA, 2005).

Com o advento da taxonomia numérica (SNEATH; SOKAL, 1962) e o surgimento da computação, dados fenotípicos começaram a ser analisados por coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens. Assim, a taxonomia numérica veio proporcionar maior objetividade aos esquemas de classificações microbianas (VANDAMME et al., 1996).

A aplicação de taxonomia numérica levou a avanços significativos na classificação dos microrganismos, com ênfase para as bactérias. Bons exemplos de gêneros cuja taxonomia foi modificada substancialmente com essa abordagem incluem os *Bacillus*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (GOODFELLOW, 2000).

Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de microrganismos sofreu profundas alterações, visando obter um sistema que refletisse melhor as relações evolutivas entre os organismos e tentando aproximar a classificação microbiana da realidade biológica (THOMPSON; OLIVEIRA, 2005).

Perante todos esses avanços de tecnologia e avanços operacionais na forma de entender os processos evolutivos em procariotos, acredita-se ser oportuno reconsiderar que seja possível fornecer um maior entendimento entre espécie operacional “definição” e uma teoria baseada em espécie “conceito”, envolvendo os microrganismos que atualmente estão pouco caracterizados ou, ainda, serão descobertos (GEVERS et al., 2005).

As tentativas de ordenar a diversidade de organismos existentes no planeta têm acontecido com grande empenho. Com isso, em vista do número elevado de microrganismos que ainda existem para serem identificados e classificados, bem como do rápido crescimento na geração de dados, está ocorrendo um refinamento cada vez maior nas análises taxonômicas. Desse modo, a biosistemática moderna tem adquirido cada vez mais importância dentro da microbiologia.

Outros grupos de microrganismos que também foram afetados com todos esses avanços e, assim, reclassificados, ou mesmo novas espécies descobertas, foram os rizóbios. Apesar da simbiose estabelecida entre rizóbios e leguminosas ser uma das interações planta-bactéria mais estudadas (SPAINK et al., 1998; SADOWSKY; GRAHAM, 2002), o conhecimento que temos sobre uma classificação correta das bactérias ainda é limitado e fragmentado (SADOWSKY; GRAHAM, 1998).

Essa simbiose beneficia diretamente as populações de rizóbios dentro dos nódulos, proporcionando proteção e fontes de carbono e energia necessárias para seu crescimento e manutenção (LONG, 1989; BROCKWELL et al., 1995; SADOWSKY; GRAHAM, 2002). Essa associação dos rizóbios com as leguminosas permite que as plantas hospedeiras, colonizem habitats deficientes em nitrogênio, onde cresceriam somente com outros tipos de intervenções, como por exemplo, a utilização de compostos químicos, como os fertilizantes nitrogenados.

No Brasil, a “Coleção Brasileira de Cultura de *Rhizobium* SEMIA”, da FEPAGRO-MIRCEN [Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Rio Grande do Sul, Brasil) - Centro de Pesquisa Microbiológica] armazena bactérias importantes, dentre elas 142 estirpes elite de rizóbios, que são autorizadas para produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2006). Contudo, apesar de apresentarem uma grande importância econômica, a caracterização genética dessas bactérias ainda é deficiente. Devido a esses fatores, uma caracterização mais detalhada é necessária. Em relação ao marcador molecular gene ribossomal 16S, 122 estirpes de rizóbios da coleção de culturas SEMIA foram seqüenciadas, e destas, 103 foram reclassificadas em nível de gênero e até de espécie (MENNA et al., 2006; BINDE, et al., 2009).

Nesse contexto, este trabalho teve, por objetivo, buscar minimizar as desvantagens do uso exclusivo do gene ribossomal 16S em filogenias, principalmente de rizóbios, visto que este gene tem um alto nível de conservação, fazendo com que espécies muito relacionadas nem sempre possam ser distinguidas (SULLIVAN et al., 1996; VAN BERKUM et al., 2003; gevers et al., 2005; Vinuesa et al., 2005; MARTENS et al., 2007). Assim, estudos de genes “housekeeping” adicionais, como exemplo, o gene *glnII* (glutamina sintetase), esta enzima catalisa a adenosina trifosfato-dependente na síntese de glutamina através da condensação de amônio e glutamato e, portanto, desempenha um papel essencial na assimilação de amônio e biossíntese glutamina (WEIR, 2006), sendo portanto uma enzima chave

no metabolismo do nitrogênio (TURNER; YOUNG, 2000). Esse gene pode contribuir substancialmente para uma melhor definição das espécies. Para isso, foram utilizados 23 estirpes elite autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de utilizar seqüências do gene *glnII* como uma ferramenta adicional nos estudos de filogenia molecular, fazendo análises comparativas com o gene ribossomal 16S, na análise de 23 estirpes elite de rizóbios autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil para 21 leguminosas hospedeiras.

2.12.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Realizar a análise filogenética de 23 estirpes e estirpe tipo (*type strain*) de diferentes espécies de rizóbios com base no gene conservado (*housekeeping*) *glnII* (codificador da enzima glutamina sintetase) e comparar essa filogenia como aquela baseada no gene ribossomal 16S;

b) Realizar a análise dos genes *glnII* e 16S concatenados, visando uma melhor definição das relações filogenéticas entre as 23 estirpes de rizóbios.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.23.1 ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS E RIZÓBIOS

Estima-se que a divergência dentro da família Leguminosae (Fabaceae nos Estados Unidos) ocorreu há mais de 65 milhões de anos sendo, hoje, descritas aproximadamente 18.000 espécies, classificadas em 650 gêneros, e que ocupam praticamente todos os biomas terrestres (POLHILL; HAVEN, 1981; HERENDEEN et al., 1992). Uma característica típica dessa família é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem, com algumas exceções. A família é subdividida em três subfamílias muito distintas: Faboideae (ou *Papilionoideae*), Caesalpinioideae (ou *Caesalpinaceae*) e Mimosoideae (ou *Mimosaceae*). A variação no nome se deve à coexistência atual de mais de um sistema de classificação. Quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes e, menos frequentemente, caule com bactérias chamadas coletivamente como rizóbios, que fixam o nitrogênio (N₂) da atmosfera, uma característica ecológica de extrema importância. Também são de grande importância econômica para a nutrição de plantas importantes para a produção de grãos, como a soja (*Glycine max*), a ervilha (*Pisum sativum*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a alfafa (*Medicago sativa*) e o grão-de-bico (*Cicer arietinum*), além de inúmeras espécies arbóreas utilizadas comumente na recuperação dos solos e em reflorestamentos.

A diversidade genética de espécies arbóreas que realizam simbiose com rizóbios, bem como sua capacidade de nodulação, é um fator a ser considerado na recuperação de solos em sistemas de produção sustentáveis. Algumas estimativas sobre a contribuição da fixação biológica do nitrogênio (FBN) para leguminosas arbóreas foram efetuadas, e entre gêneros de maior potencial estão a *Acacia*, a *Albizia*, a *Calliandra*, a *Gliricidia*, o *Inga*, a *Leucaena* e o *Prosopis* (FORTES et al., 2004).

O crescimento contínuo da população mundial representa um desafio para a agricultura, no sentido de tornar a produção de alimentos mais

eficiente. A população e as culturas agrícolas competem continuamente por espaço, tornando necessário que a produtividade das áreas cultivadas seja aumentada, de forma a manter um nível satisfatório de produção de alimentos. O aumento da produtividade agrícola, por sua vez, torna necessária a adoção de tecnologias modernas de produção, o que nem sempre é possível, especialmente em países menos desenvolvidos, onde o aumento na população e na demanda de alimentos ocorre mais rapidamente que a adoção de novas tecnologias de produção (Araújo, 1994). O fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), também é um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos em relação às leguminosas (HUNGRIA et al., 1997).

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 FBN 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).

Os mais de cem anos de pesquisa sobre a FBN foram insuficientes para que se pudesse entender o que torna uma determinada estirpe mais competitiva ou eficiente do que outras. O conhecimento das bases da competitividade nodular e da eficiência biológica do processo, juntamente com o auxílio de ferramentas moleculares para se conhecer detalhes desses microrganismos representam várias possibilidades aos pesquisadores. Entre elas, poderiam permitir a obtenção de inoculantes com maiores chances de sucesso, oferecendo uma alternativa efetiva e de baixo custo para a melhoria da nutrição nitrogenada de várias culturas alimentícias, de leguminosas utilizadas na recuperação do solo e em reflorestamento (ARAÚJO, 1994).

No cultivo de leguminosas introduzidas, essas podem se associar com rizóbios nativos ou com estirpes de rizóbio introduzidas no solo por meio de inoculação nas sementes ou no próprio solo (BALA et al., 2003).

A classificação atualmente reconhecida dos rizóbios da subclasse α -*Proteobacteria* pelo Manual de Bergey (MADIGAN, et al., 2000), mostram que os rizóbios são classificados em quatro famílias da ordem Rhizobiales: Rhizobiaceae, que inclui os gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*; Phyllobacteriaceae, que contém *Mesorhizobium*; Hiphomicrobiaceae, que inclui *Azorhizobium* e Bradyrhizobiaceae, que inclui o gênero *Bradyrhizobium*. Os gêneros de rizóbios estão filogeneticamente

relacionados com algumas bactérias de vida livre (patógenas), como *Rhodopseudomonas*, *Azospira* e *Brucella* (WILLEMS; COLLINS, 1993; VAN BERKUM; EARDLY, 1998; SADOWSKY; GRAHAM, 2002). Contudo, o conceito de rizóbios está mudando. Nesta década foi relatado que uma metilobactéria (α -Proteobacteria) seria nodulante e fixadora de N_2 , sendo proposta a nomenclatura *Methylobacterium nodulans* (SY et al., 2001). Além disso, outras bactérias têm sido descritas como capazes de realizar a FBN, dentre elas: *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium* dentro da classe α -Proteobacteria e *Burkholderia* e *Ralstonia* dentro das β -proteobacteria. Desse modo, verificou-se que a FBN com estas bactérias é mais comum do que se acreditava (CHEN et al., 2001; MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2003; WILLEMS, 2006).

3.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N), após o carbono (C), o oxigênio (O) e o hidrogênio (H) é o elemento mais importante na constituição da matéria orgânica, sendo o quarto elemento mais abundante nas plantas e representando cerca de 8% a 16% de sua composição. O N é constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e 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 a 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 tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 , uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza (HUNGRIA et al., 1994). O N necessário para a cultura pode ser obtido de três formas: diretamente do solo, através do uso de fertilizantes

nitrogenados e pela FBN, pela simbiose com algumas bactérias denominadas diazotróficas.

O solo é uma fonte limitada de N, que se esgota após alguns cultivos. Além disso, as condições de temperatura e umidade predominantes no território brasileiro aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica e de perdas de N, resultando em solos com teores pobres desse nutriente. Deve-se considerar, ainda, que a preservação da matéria orgânica com uma relação C/N adequada é importante para a manutenção dos microrganismos do solo, sem os quais a sustentabilidade dos sistemas agrícolas é inviável. A fixação abiótica, isto é, independente da ação de organismos vivos é pequena e variável (HUNGRIA et al., 2001).

Os fertilizantes, além de apresentarem um alto custo, contribuem para a contaminação do meio ambiente. A FBN é um processo realizado por determinados procariontes, denominados organismos fixadores de nitrogênio. As bactérias capazes de fixar biologicamente o N_2 possuem uma enzima chamada dinitrogenase, que é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2 , a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina, a qual, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína que, então, reduzida, doa os elétrons recebidos para a MoFe-proteína, a qual acumula os elétrons até que ocorram oito transferências concentrando oito elétrons, os quais são necessários para que a redução do N_2 à NH_3 ocorra (MORGANTE, 2003).

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

Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, mas a um custo elevado, como já citado. O processo industrial que transforma o N_2 em amônia (NH_3) requer alguns itens, entre eles: hidrogênio (derivado de gás de petróleo); catalisador contendo ferro; altas temperaturas (300 a 600°C) e altas pressões (200 a 800 atm). Assim, o gasto de fontes energéticas não renováveis é estimado em seis barris de petróleo por tonelada de NH_3 sintetizada. A eficiência de uso de fertilizante nitrogenado raramente é superior a 50%, desse modo, em um curto espaço de tempo, cerca de

metade do fertilizante aplicado é perdida pelos processos de lixiviação e transformação em formas gasosas, como desnitrificação ou volatilização. Deve-se considerar, ainda, que o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados resulta em poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Desse modo, é importante que o uso racional de fertilizantes nitrogenados seja estabelecido. Além disso, pela utilização do processo biológico, torna-se mais fácil concretizar as metas de uma agricultura moderna, que visa a obtenção de tetos máximos de produtividade, com a melhor relação custo-benefício e impacto ambiental mínimo (HUNGRIA et al., 2001).

3.3 OS RIZÓBIOS E O PROCESSO DE NODULAÇÃO

Bactérias da ordem Rhizobiales formam estruturas altamente específicas nas raízes de diversas espécies de plantas da família Leguminosae, onde ocorre a conversão do N_2 a amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico.

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

Esta interação é considerada uma simbiose mutualista (LONG, 1989; SPAINK et al., 1998), mas não é obrigatória, se trata mais de uma relação de cooperação do que em mutualismo em sentido estrito (CHENG, 1991).

Todos os rizóbios capazes de nodular leguminosas identificados até o presente momento carregam genes de nodulação que determinam a produção de quitinooligossacarídeos conhecidos como fatores de nodulação ou “Fatores Nod” (FN). Esses genes se encontram presentes em ilhas simbióticas, ou em plasmídeos

simbióticos (CULLIMORE et al., 2001). Os FNs são constituídos de oligômeros de quitina de resíduos β -(1-4) N-acetil-D-glucosamina, que são N-acetilados no final não-redutor na cadeia acil. O esqueleto quitinooligossacarídico é sintetizado sob o controle dos genes *nod* comuns, denominados: *nodC* (N-acetilglucosamina transferase), *nodB* (deacetilase) e *nodA* (acil transferase), todos apresentando grau elevado de homologia entre os rizóbios (DOWNIE, 1998). Esta estrutura descrita em vários rizóbios inicialmente foi descrita em *Rhizobium meliloti*, que depois foi classificado como *Sinorhizobium meliloti* e, atualmente, é classificado como *Ensifer meliloti* (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Os genes de nodulação evoluíram em função da espécie de leguminosa a qual eles nodulam, com o objetivo de estabelecer uma nodulação efetiva. Com isso é possível que a filogenia dos genes de nodulação possa se correlacionar com a planta hospedeira, com a bactéria, ou mesmo com sua origem biogeográfica (YOUNG; JOHNSTON, 1989; DOBERT et al., 1994; BROUGHTON; PERRET, 1999).

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

Sinais moleculares, particularmente flavonóides, induzem a transcrição de genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias, conduzindo à síntese e secreção dos fatores Nod. Os fatores Nod são responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. As bactérias são atraídas à rizosfera, onde vão se multiplicar, colonizando os tricomas (pêlos) radiculares. Os tricomas enrolam-se, envolvendo grupos de bactérias que, em seguida, degradam uma porção de sua parede celular, levando à invaginação do plasmalema. As bactérias, então, invadem o tricoma, utilizando o canal formado pela invaginação do plasmalema, originando o cordão de infecção (HUNGRIA et al., 1994; MORGANTE, 2003).

A seguir, o cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando. A região do córtex da raiz, com intensa divisão celular, recebe o nome de nódulo primário. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção se ramifica para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias, contidas no interior de vesículas membranosas, são liberados dentro do citoplasma das células vegetais do nódulo primário. A partir desse estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias, que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras, param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bactérias especializadas na FBN, os bacteróides (MORGANTE, 2003).

3.4 TAXONOMIA E FILOGENIA BACTERIANA

De acordo com Vandamme et al. (1996), a taxonomia pode ser usada como sinônimo de "Biossistemática", 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 biossistemática moderna.

Atualmente, a taxonomia microbiana integra diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) para obter um consenso taxonômico, sendo denominada de taxonomia polifásica. Para estudos genotípicos, as informações são obtidas a partir de ácidos nucleicos, tanto do DNA, como do RNA e como exemplo, podem ser citadas várias técnicas utilizadas para este fim, como: porcentagem de G + C do genoma, hibridização DNA-DNA, padrões de restrição do DNA (RFLP, PFGE), seqüenciamento de genes e PCR "fingerprinting" (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT, 2002). Os estudos de avaliação fenotípica, bioquímica e genética incluem análises de morfologia, fisiologia, sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolossacarídeos, padrões

enzimáticos (Multilocus Enzyme Electrophoresis), entre outros (GILLIS, et al., 1995; VANDAMME et al., 1996).

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana e, desde a década de 1970, é definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe padrão, que apresentam 70% ou mais de similaridade por hibridização DNA-DNA (DDH) (5°C ou menos nos valores de ΔT_m), é amplamente utilizada na determinação de espécies na taxonomia bacteriana, e utilizada há várias décadas (GEVERS et al., 2005).

A DDH possui dados consistentes com os recentes resultados de sequenciamento do genoma completo e dados multilocus. No entanto, possui algumas limitações: I) é um procedimento que demanda um grande consumo de tempo, II) realizado de forma confiável em poucos laboratórios pré-determinados e III) demonstra ser indisponível para a classificação de procariotos não cultiváveis (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005).

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

Woese e George (1977) demonstraram a vantagem de se utilizar o RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo (16S e 18S) como marcadores filogenéticos moleculares universais. Assim, os estudos de Carl Woese sugeriram uma relação natural entre os microrganismos, na qual uma nova sistemática poderia estar baseada e propuseram uma árvore filogenética universal com base nos genes ribossomais 16S e 18S, onde os organismos seriam agrupados nos domínios Bacteria, Archaea e Eucaria, sendo as bactérias subdivididas nos domínios Bacteria e Archaea e os organismos eucariontes agrupados no domínio Eucaria (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. Nesses estudos, foram feitas estimativas de tempo e de divergência entre os organismos, em função das variações ocorridas ao longo do tempo nas seqüências nucleotídicas (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

Com relação ao gene ribossomal 16S, o consenso atual é o de que bactérias apresentando seqüências com similaridades superiores a 97% em relação às estirpes tipo definidas para cada espécie podem indicar uma nova espécie (GEVERS et al., 2005).

Um grande impacto do uso de seqüências do gene ribossomal 16S como ferramenta na classificação microbiana se deu em estudos de diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais, como exemplo, na utilização de metodologias para microrganismos que não são cultiváveis, ocorrendo assim, uma drástica mudança na perspectiva da diversidade microbiana existente no ambiente. Diversos grupos de microrganismos nunca antes cultivados puderam ser detectados no ambiente por meio das seqüências do gene ribossomal 16S e, através da comparação com seqüências depositadas em bases de dados, observou-se que muitas delas pertenciam a organismos filogeneticamente não relacionados às divisões bacterianas já existentes (PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998a).

Este impacto na visão da diversidade microbiana pode ser exemplificado pelo número de divisões existentes dentro do Domínio Bactéria: em 1987, eram 12 divisões, todas elas descritas com base em organismos cultiváveis; já em 1998, o número de divisões publicadas havia subido para 36 (HUGENHOLTZ et al., 1998b), sendo 13 delas divisões candidatas, ou seja, sem representante cultivável e descrição formal. Um levantamento mais recente, publicado em 2003, apontou como 53 o número de divisões dentro do Domínio Bactéria, sendo que aproximadamente 50% destas não possuem representantes cultiváveis (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). Hoje, um dos maiores desafios para taxonomistas é o cultivo de representantes destas divisões.

Embora a filogenia bacteriana esteja baseada na análise do gene ribossomal 16S, alguns estudos demonstraram que esses genes podem, ocasionalmente, sofrer transferência lateral e recombinação genética, resultando em seqüências mosaicas (MARTENS et al., 2007) e, de fato, aparentemente nenhum gene com regiões conservadas está imune a eventos de transferência horizontal (OCHMAN; MORAN, 2001). Estas observações implicam em que a análise filogenética bacteriana com base exclusivamente no gene ribossomal 16S pode nem sempre refletir a filogenia dos procariotos. Uma outra desvantagem do uso exclusivo do gene ribossomal 16S nos estudos de taxonomia, filogenia e evolução é que espécies muito relacionadas nem sempre podem ser distinguidas, pelo fato destas

apresentarem um alto nível de conservação nas seqüências nucleotídicas do gene ribossomal 16S e, assim, não permitir a detecção de divergências evolutivas (STACKEBRANDT et al., 2002).

Embora as seqüências dos genes ribossomais 16S e a hibridização DNA-DNA continuem sendo consideradas como critérios moleculares para o delineamento de espécies, espera-se que muitas informações taxonômicas adicionais possam ser obtidas a partir de seqüências genômicas completas (COENYE et al., 2005). O conteúdo e ordem gênica, a análise comparativa de seqüências de macromoléculas conservadas, a análise de presença e ausência de genes, a composição de nucleotídeos, bem como a distância filogenética com base no BLAST genômico, são alguns exemplos de métodos recentes baseados na genômica e que podem ser utilizados na taxonomia.

Ao final dos anos 90, outros genes conservados começaram a ser utilizados para comparar e melhorar as filogenias construídas com genes ribossomais e muitos deles têm sido utilizados em estudos de filogenia de rizóbios (GEVERS et al., 2005; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005; STEPKOWSKI et al., 2005; MARTENS et al., 2007). Entre esses genes, podem-se citar: *glnA* e *glnII* (TURNER; YOUNG, 2000), que codificam para a enzima glutamino sintetase GSI e GSII, respectivamente; *atpD*, que codifica para a subunidade β da ATP sintetase (GAUNT et al., 2001); *recA* (EISEN, 1995; GAUNT et al., 2001), que codifica para a proteína do sistema de recombinação homóloga em bactéria; *dnaK* (STEPKOWISKI et al., 2003), que codifica para uma proteína chaperônica envolvida em vários processos celulares.

Atualmente, tem sido proposta uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana, a qual consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci), como exemplo, os genes citados acima, os quais apresentam uma taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais (GEVERS et al., 2005). Desta forma, a análise conjunta de múltiplos genes poderia funcionar como um “tampão” contra efeitos de recombinação ou transferência lateral ocorridos em um único gene específico. Com base nessa estratégia, foi então desenvolvida e implementada, para alguns grupos bacterianos, principalmente em bactérias patogênicas, a metodologia de “Multilocus Sequence Typing” (MLST). O MLST consiste no seqüenciamento e análise conjunta (como uma única seqüência concatenada) de, no mínimo, cinco genes “*housekeeping*” (STACKEBRANDT et al.,

2002). O MLST tem sido principalmente utilizado, na epidemiologia molecular, para discriminação em níveis infra-específicos, ou seja, na diferenciação de estirpes da mesma espécie (GEVERS et al., 2005). De acordo com Zeigler (2003) e Thompson et al. (2005), estes genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios, como: (I) estarem distribuídos no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; (II) estarem no genoma em uma única cópia; (III) terem extensão nucleotídica suficiente que permita o seqüenciamento; e (IV) contenham informações suficientes para as análises; e (V) que os dados obtidos com o uso destes genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA.

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

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

Apesar da metodologia do MLSA apresentar grandes benefícios, estudos com apenas um gene “housekeeping”, comparados ao gene ribossomal 16S, podem também trazer resultados úteis e serem utilizados como uma ferramenta

adicional, para um melhor conhecimento sobre a evolução do genoma e relações filogenéticas em rizóbios (HERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2004).

3.5 TAXONOMIA E FILOGENIA NA ORDEM *RHIZOBIALES*

O genoma dos rizóbios conta com características que permitem perder e adquirir informações simbióticas frequentemente na natureza, e o descobrimento de que, em condições naturais as informações simbióticas se transferem e que a maioria dos rizóbios do solo trocam essas informações simbióticas, tem mostrado ser um divisor de águas no ponto de vista da ecologia evolutiva dos rizóbios (SOBERÓN-CHAVEZ; NÁJERA, 1988; SEGOVIA et al., 1991; WERNEGREEN; RILEY, 1999).

O genoma das bactérias do gênero *Rhizobium* e *Ensifer* é constituído por um cromossomo circular e vários plasmídeos (FREIBERG et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 2003). Até o presente momento, os genomas seqüenciados de *Rhizobium* e *Ensifer* têm entre 4.000 e 5.000 kb, e os plasmídeos podem ser de tamanho variável de 25 kb a cerca de 2000 kb. A maioria dos genes necessários para estabelecer a nodulação e a fixação do nitrogênio se localizam dentro de um plasmídeo grande, denominado plasmídeo simbiótico “pSym”. Em *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* a presença de plasmídeo é menos freqüente, estas bactérias têm um cromossomo entre 8.000 e 9.000 kb e a informação genética para a simbiose está comumente agrupada em uma região do cromossomo chamado ilha simbiótica, o que acontece também com *Azorhizobium* (LONG, 1989; KANEKO et al., 2000, 2002; ROMERO; BROOM, 2004).

Os rizóbios estão entre os grupos mais intensamente estudados de microrganismos (SESSITSCH et al., 2002). Formam um grande e diverso grupo de bactérias do solo, que são capazes de nodular plantas leguminosas, realizando o processo de FBN. Nos últimos anos, a classificação dessas bactérias passou por mudanças e revisões, com a descrição de novas espécies e a reclassificação de outras (YOUNG; HAUKKA, 1996; ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001; BROUGHTON, 2003; SAWADA et al., 2003).

O amplo uso de leguminosas na produção de alimentos, como forrageiras e adubos verdes, entre outros, é principalmente associado com a habilidade dessas plantas de estabelecer associações simbióticas no caule e, principalmente, nas raízes dessas plantas, onde ocorre o processo de FBN, como já citado anteriormente (ALLEN; ALLEN, 1981).

Iniciamente, todas as bactérias isoladas de nódulos de raízes de leguminosas e capazes de realizar a fixação biológica do N₂ foram classificadas dentro do gênero *Rhizobium* (FRED et al., 1932). Mas, embora a simbiose e o processo de fixação biológica do N₂ tenham sido conhecidos há mais de 120 anos, a década passada foi extremamente importante, quebrando paradigmas na ecologia destas bactérias, o que foi propiciado, principalmente, pelas modernas ferramentas moleculares disponíveis (GRAHAM, 2006).

Posteriormente, a classificação das espécies de rizóbios foi aprimorada, utilizando as análises de características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (JORDAN, 1984). Com base nesse conceito, Graham (1964) dividiu as bactérias de crescimento lento e rápido em meio de cultura específico. Posteriormente, as que possuíam crescimento lento (de cinco a sete dias) e que, inicialmente, eram denominadas de *Rhizobium japonicum*, foram reclassificadas como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982), enquanto que as bactérias de crescimento rápido (dois a três dias) permaneceram no gênero *Rhizobium*. Logo em seguida, outros cinco gêneros foram incluídos: *Agrobacterium* (CONN, 1942), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1988) e *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998), o qual possui a espécie *Allorhizobium undicola* como única representante da espécie.

Bactérias do gênero *Agrobacterium* foram, na última década, reclassificadas, com base no gene ribossomal 16S, como *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001). Contudo, as diferenças entre *Agrobacterium* e *Rhizobium* apontam para as necessidades de novos estudos (FARRAND et al., 2003).

A filogenia baseada no gene ribossomal 16S mostra, também, que *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Allorhizobium* são muito relacionados e deveriam constituir um único gênero (TEREFEWOR et al., 1998; de LAJUDIE et al., 1998; WILLENS, 2006). A partir dessas observações, Young et al. (2001) propuseram a

união destes três gêneros em apenas um, *Rhizobium*, mas essa sugestão ainda não é totalmente aceita (FARRAND et al., 2003).

Sete espécies foram descritas, até 2006, no gênero *Bradyrhizobium*: *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. denitrificans*, *B. betae*, *B. canariense* e *B. japonicum* (WILLENS, 2006). No Brasil, os inoculantes comerciais para a cultura da soja (*Glycine max*), carregam estirpes das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*.

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 outra 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. Posteriormente, porém, foi proposto a união de todas as espécies de *Sinorhizobium* junto com a espécie *Ensifer adhaerens* dentro de um único gênero, *Ensifer*, como já citado (YOUNG et al., 2003; MARTENS et al., 2007).

Compreendendo uma faixa intermediária na velocidade de crescimento, aproximadamente quatro dias, e nodulando uma diversidade de leguminosas, estão as bactérias do gênero *Mesorhizobium*, com 15 espécies já foram descritas, *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarium*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* e *M. Thiogangeticum*, *M. albiziae*, *M. caraganae*, *M. gobiense*, *M. tarimense* (WILLENS, 2006; WANG et al., 2007; GUAN et al., 2008; HAN et al., 2008).

Atualmente, os taxonomistas bacterianos recomendam o uso da taxonomia polifásica para a identificação e classificação dos microrganismos. Algumas técnicas podem ser utilizadas como discriminantes em diferentes níveis, os quais podem variar desde espécie e gênero, até níveis mais altos, dependendo de fatores como: número e espécie em estudo, objetivo do estudo em questão e condições na aplicabilidade da técnica. Essa taxonomia, porém, deve incluir, obrigatoriamente, estudos filogenéticos com base no gene ribossomal 16S (ZAKHIA; LAJUDIE, 2001).

A filogenia dos rizóbios, como em outras bactérias, também é baseada no gene ribossomal 16S. Um estudo recente com o gênero *Sinorhizobium*,

reclassificado como *Ensifer* (MARTENS et al., 2007), demonstrou que a técnica de MLSA, utilizando cinco genes “housekeeping”, foi mais apropriada para a classificação deste gênero, quando comparada com a análise apenas do gene ribossomal 16S. Nesse trabalho, os autores utilizaram como marcadores filogenéticos os seguintes genes: *dnaK* (proteína de choque térmico) (STEPKOWSKI et al., 2003), *glnA* (glutamina sintetase) (WERNEGREEN; RILEY, 1999; TURNER; YOUNG, 2000), *gltA* (sintase do citrato) (HERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2004), *recA* (recombinase A) (GAUNT et al., 2001) e *thrC* (sintase da treonina) (HERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2004; MARTENS et al., 2007).

A duplicação dos genes antes da separação entre as linhagens tem sido utilizada para mostrar seu tempo de divergência (IWABE et al., 1989). Como exemplo, o gene ancestral da glutamina sintetase (GS) se duplicou antes da separação entre procariontes e eucariontes (PESOLE et al., 1995), e a comparação entre os genes parálogos GSI e GSII tem permitido calibrar o tempo de divergência entre as linhagens que os possuem, com isso, se demonstra que esses genes também podem ser utilizados como cronômetros moleculares, datando o tempo de divergência entre as linhagens de rizóbios. A hipótese da utilização de um relógio molecular, além do gene ribossomal 16S, é colocada como uma solução para as relações filogenéticas e eventos de especiação (TURNER; YOUNG, 2000).

A glutamina sintetase é a enzima chave para a assimilação do nitrogênio, sendo extremamente importante no metabolismo desse nutriente e é uma enzima indispensável para a FBN. A GS é encontrada em quatro diferentes formas: GSI, que é associada com procariotos, uma segunda forma, GSII, presente em eucariotos e em alguns procariotos, uma terceira forma, GSIII, que é somente encontrada em bactérias anaeróbicas como *Bacteroides fragilis* e *Butyrivibrio fibrisolvens* e a quarta forma *glnT*, que seria mais relacionada à GSI, sendo encontrada comumente em *Rhizobium* (HILL, et al., 1989; CHIURAZZI et al., 1992; GOODMAN; WOODS, 1993; SHATTERS; LUI; KAHN, 1993; PESOLE et al., 1995).

Pesole et al. (1991) já propunham que a GS, seria um marcador molecular ideal, além de ser a chave no metabolismo central do nitrogênio, pois está presente em todos os organismos comumente estudados e, em contraste com o gene ribossomal 16S, contém maior variabilidade. Desse modo, a análise desse gene pode levar a resultados mais consistentes, não apenas em nível de gênero,

mas também em nível de espécie, sendo uma segunda opção nas análises filogenéticas, em complementação ao gene ribossomal 16S.

Molouba et al. (1999) colocam que *Bradyrhizobium* é o único rizóbio que tem conservada a capacidade de fotosintetizar e fixar N₂ em condições de vida livre e sua simbiose o diferencia dos demais gêneros de rizóbios que somente são capazes de fixar N₂ em simbiose. É sugerido que *Bradyrhizobium* poderia ser a linhagem mais antiga das formas ancestrais (MARTINEZ-ROMERO, 1994).

A possibilidade dos rizóbios começarem a divergir antes da existência das leguminosas, sugere que o último ancestral comum dos rizóbios já existia antes da origem de seu hospedeiro (LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005). Assim, esses autores, analisando seqüências conservadas e universais de genes parálogos, e as ocorrências de substituição de códons com troca de aminoácidos em genes ortólogos, propuseram uma escala de tempo para a origem e evolução dos rizóbios (Figura 1).

A distribuição dos rizóbios em subclasses α e β das Proteobacterias, juntamente com bactérias não simbióticas (YONG, 1993; MARTINEZ-ROMERO; 1994), gera dúvidas sobre a evolução da simbiose. Será que houve ou não uma evolução independente de várias linhagens de Proteobacterias? Será que surgiu um ancestral comum e se perdeu em seus parentes não simbióticos? Desenvolveu-se uma linhagem e a capacidade de FBN foi transferida a outros? A reconstrução filogenética com base nos genes de nodulação indica um ancestral comum entre eles (UEDA et al., 1995; WERNEGREN; RILEY, 1999, LAGUERRE et al., 2001), e indica que a hipótese de evolução independente é pouco provável. As maiores evidências são da existência de uma linhagem simbiótica única, e qual transferiu informações a outros (YOUNG; JOHNSTON, 1989).

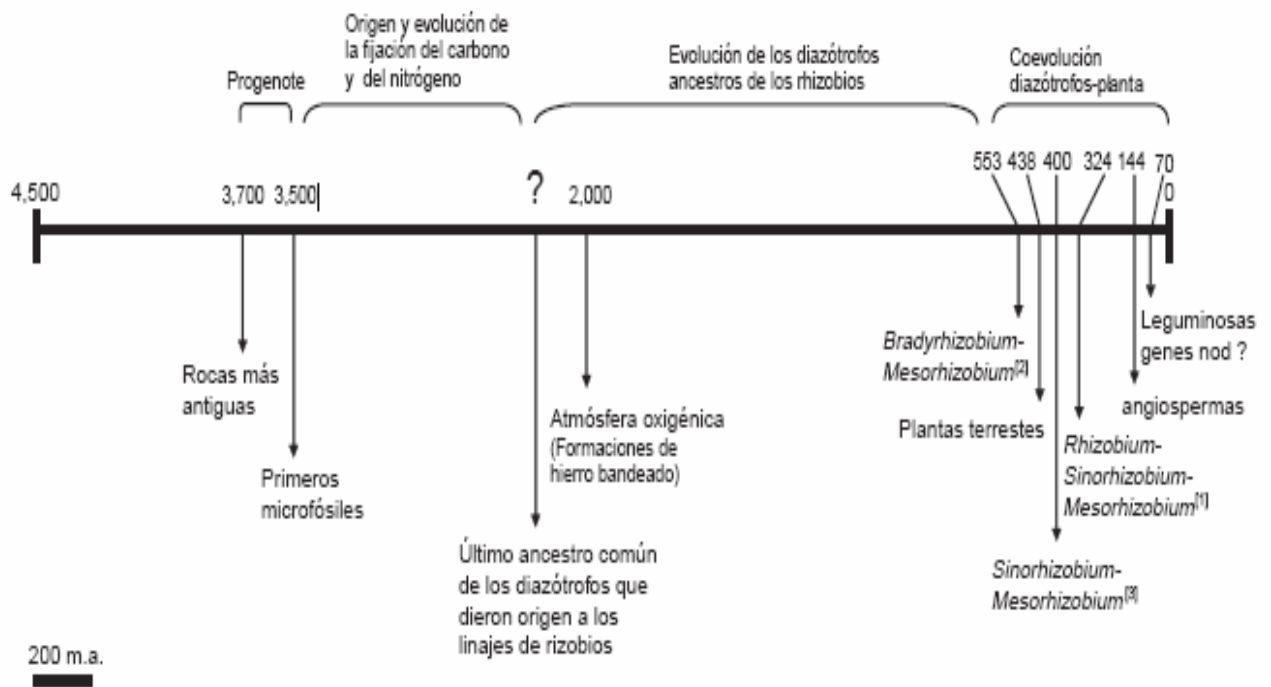


Figura 1 – Escala de tempo, demonstrando a origem e evolução dos rizóbios, a partir da seqüência dos genes parálogos *glnA* e *glnII*, e substituição de códons com troca de aminoácidos em genes ortólogos

Fonte: (LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005).

O N, como já citado, é extremamente importante para as plantas, por ser indispensável para a produção de muitos compostos essenciais e estar diretamente relacionado com a constituição de sua matéria orgânica. Existem algumas formas para que a planta possa utilizar o N, visto que esta não consegue utilizar diretamente do nitrogênio atmosférico (N₂). Dentre as formas de N disponíveis, pode-se citar o uso de fertilizantes nitrogenados e a FBN. São dois processos de extrema importância econômica e agrônômica. Atualmente é fundamental traçar metas e agir de forma racional em relação a todas as informações que são obtidas, analisando de forma concreta todos os benefícios e malefícios que possam vir a ocorrer em relação à utilização dos fertilizantes nitrogenados. O uso desses fertilizantes é um processo com custo-benefício muito alto e com um grande impacto ambiental. A utilização de bactérias (rizóbios) altamente eficientes no processo de FBN para a produção de inoculantes, não é um processo simples, mas sim um processo laborioso de pesquisa, envolvendo técnicas

cada vez mais elaboradas de prospecção de estirpes e controle de qualidade das estirpes selecionadas para, assim, dar suporte para todos esses estudos. Uma etapa fundamental nesse processo é a de identificar, nomear e classificar, de maneira correta, as bactérias que também realizam ao processo de FBN. A classificação correta dessas bactérias é importante não apenas para confirmar características essenciais, por exemplo, de que não se trata de um patógeno, como também para efeitos de conhecimento e catalogação da biodiversidade (ARAÚJO, 1994; HUNGRIA et al., 2001; MORGANTE, 2003; MENNA et al., 2006).

Existe, portanto, a necessidade de se implementar programas bem sucedidos para a seleção adequada de estirpes elite de rizóbios para cada leguminosa hospedeira de interesse. A Coleção Brasileira de Cultura de *Rhizobium* SEMIA foi criada em 1985 pelo Centro de Pesquisa Microbiológica MIRCEN, com o propósito de manter as estirpes de rizóbios recomendadas e distribuir as culturas para as indústrias de inoculantes (HUNGRIA et al. 2005). Embora a coleção de SEMIA represente um reservatório de rizóbios selecionados por décadas de pesquisa, o conhecimento adequado da genética sobre essas estirpes ainda é pouco estudado (MENNA et a., 2006). Dessa forma, é importante utilizar técnicas de biologia molecular para a caracterização genética dessas estirpes e levá-las cada vez mais próximas de um consenso taxonômico. Finalmente, é de interesse comparar a classificação taxonômica e as relações filogenéticas entre essas estirpes com a sua capacidade de FBN com a respectiva leguminosa hospedeira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES UTILIZADAS

Foram utilizados vinte e três estirpes elite da “Coleção Brasileira de Cultura de *Rhizobium* SEMIA”, da FEPAGRO-MIRCEN [Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Rio Grande do Sul, Brasil) - Centro de Pesquisa Microbiologica]. Essas estirpes são autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil para 21 espécies de leguminosas. As estirpes e suas respectivas plantas hospedeiras são listadas na Tabela 1. A classificação taxonômicas das estirpes nessa tabela é baseada na análise do gene ribossomal 16S, previamente determinada por Menna et al. (2006) e Binde et al., (2009). As estirpes utilizadas neste estudo foram obtidas de estoque da “Coleção de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” da Embrapa Soja.

Tabela 1 – Estirpes que foram utilizadas nesse estudo.

| SEMIA número | Espécies | Fonte das estirpes | Espécies de plantas (°) | Tribo(d) | Nome comum(d) | Subfamília (d) |
|-------------------|---|--------------------|------------------------------|------------|------------------------------|----------------|
| 384 ^a | <i>Rhizobium etli</i> | Brasil | <i>Vicia sativa</i> | Viceae | Ervilhaça | Papilionoideae |
| 396 ^a | <i>Mesorhizobium ciceri</i> | Brasil | <i>Cicer arietinum</i> | Cicereae | Grão-de-Bico | Papilionoideae |
| 696 ^a | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Australia | <i>Desmodium uncinatum</i> | Desmodieae | Desmódio | Papilionoideae |
| 816 ^a | <i>Mesorhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Lotus corniculatus</i> | Loteae | Cornichão | Papilionoideae |
| 830 ^a | <i>Mesorhizobium</i> sp. | Desconhecida | <i>Lotus glaber</i> | Loteae | Cornichão | Papilionoideae |
| 2051 ^a | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Brasil | <i>Trifolium vesiculosum</i> | Trifolieae | Trevo vesiculoso | Papilionoideae |
| 2082 ^b | <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii | Brasil | <i>Trifolium pratense</i> | Trifolieae | Trevo branco, Trevo vermelho | Papilionoideae |
| 3007 ^a | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | México | <i>Pisum sativum</i> | Viceae | Ervilha | Papilionoideae |
| 3012 ^b | <i>Mesorhizobium tianshanense</i> | Brasil | <i>Pisum sativum</i> | Fabeae | Ervilha | Papilionoideae |
| 3026 ^b | <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viceae | Brasil | <i>Lens culinaris</i> | Viceae | Lentilha | Papilionoideae |

| | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|---------|-------------------------------------|----------------|---|------------------|
| 4088 ^b | <i>Rhizobium tropici</i> | Brasil | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Phaseoleae | Feijão | Papilionoideae |
| 6053 ^a | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | Malásia | <i>Clitoria ternatea</i> | Phaseoleae | Clitória | Papilionoideae |
| 6153 ^b | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | Brasil | <i>Leucena leucocephala</i> v. Peru | Mimoseae | Leucena | Mimosoideae |
| 6154 ^b | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Stylosanthes</i> sp. | Aeschynomeneae | Estilozantes | Papilionoideae |
| 6161 ^a | <i>Sinorhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Prosopis juliflora</i> | Mimoseae | Algaroba | Mimosoideae |
| 6392 ^b | <i>Mesorhizobium amorphae</i> | Brasil | <i>Chamaecrista ensiformis</i> | Cassieae | Jaúna, Coração-de-negro | Caesalpinioideae |
| 6396 ^b | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Albizia pedicellaris</i> | Ingeae | Juerana-branca, Galinazo | Mimosoideae |
| 6407 ^b | <i>Methylobacterium mesophilicum</i> | Brasil | <i>Pithecellobium tortum</i> | Ingeae | Tataré, Jacaré, Angico-branco, Jurema, Vinhático-de-espinho | Mimosoideae |
| 6423 ^b | <i>Rhizobium rhizogenes</i> | Brasil | <i>Calliandra surinamensis</i> | Ingeae | Calliandra, Salsa Pompon de Marin | Mimosoideae |
| 6428 ^b | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Acacia saligna</i> | Acacieae | | Mimosoideae |
| 6435 ^b | <i>Rhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Gliciridia sepium</i> | Robinieae | Gliciridia ingá | Caesalpinioideae |
| 6437 ^b | <i>Rhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Adesmia latifolia</i> | Adesmieae | Adesmia | Papilionoideae |
| 6439 ^b | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Brasil | <i>Arachis pintoi</i> | Aeschynomeneae | Amendoim forrageiro | Papilionoideae |

(^a) Classificação segundo Menna et al., 2006

(^b) Classificação segundo Binde et al., 2009

(^c) Espécies de plantas para qual a estirpe é comercialmente autorizada (MAPA, 2006)

(^d) Nomes comuns utilizados mundialmente. Informações obtidas no endereço eletrônico citado no item www.ildis.org e www.biodiversityexplorer.org/plants (ILDIS, 2005)

4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As estirpes foram retiradas do estoque a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, repicadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura YM (Vincent, 1970), com a adição do corante vermelho congo (0,00125%), e crescidas a 28°C . Para a extração de DNA, as bactérias foram crescidas em meio YM líquido a 28°C por um período de 16 a 18 horas.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL

A extração de DNA das estirpes foi realizada como descrito por Fernandes et al., (2003). Após a incubação em meio YM sob agitação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Este passo foi repetido por três vezes, adicionando-se, a cada vez, 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), a fim de lavar as células e retirar o excesso de meio de cultura. Após a terceira lavagem, foi acrescentada solução fisiológica ao precipitado celular, até atingir uma concentração aproximada de 10^9 células/mL.

Um mililitro e meio desta solução foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 400 μ L de TE 50/20 (Tris a 50 mM, pH 8,0 e EDTA- Na_2 a 20 mM, pH 8,0), 50 μ L de SDS (sodium dodecyl sulfate), 10 μ L lizozima (5 mg/mL, estoque a -20°C) e 2 μ L de RNAse (10 mg/mL, estoque à temperatura ambiente) e, em seguida, a suspensão foi incubada a 37°C até clarear. Com uma ponteira de 1000 μ L cortada na ponta, o material foi aspirado lentamente, até que diminuísse a viscosidade. A esta suspensão foram adicionados 30 μ L de NaCl 5 M (concentração final de 250 mM), 60 μ L de AcONa 3M (concentração final de 300 mM) e água mili-Q até completar um volume final de 600 μ L.

Esta suspensão foi homogeneizada por inversão e armazenada a 4°C por uma hora. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm, à temperatura ambiente, por 15 minutos e, a partir do sobrenadante, foram recolhidos 300 μ L, e a este volume foram acrescentados 2 volumes de etanol 95% gelado. Em seguida, procedeu-se à homogeneização por inversão e armazenamento a -20°C por um período de 16 a 18 horas. Após essa etapa, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm, à temperatura ambiente.

Após a centrifugação o etanol foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 200 μ L de etanol a 70%. A solução foi, então, homogeneizada e centrifugada por mais 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o etanol foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 50 μ L de TE 10/1.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para verificar a concentração do DNA de cada amostra, a qual foi determinada visualmente, após coloração com brometo de etídio, por comparação com o padrão de peso molecular “Low DNA Mass”™ (Invitrogen-Life Technologies). A concentração final de cada amostra foi ajustada a, aproximadamente, 20 ng de DNA por µL.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os genes amplificados e os *primers* utilizados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – *Primers* utilizados na amplificação do gene ribossomal 16S e do *glnII*.

| Primers | Sequência sentido 5' 3' | Referência |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------|
| TS <i>glnII</i> f | GTCATGTTTCGACGGYTCYTCG | Stepkowski et al.(2005) |
| TS <i>glnII</i> r | TGGAKCTTGTTCTTGATGCG | |
| 16S rd1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | Weisburg et al.(1991) |
| 16S fd1 | AAGGAGGTGATCCAGCC | |

As condições de amplificação foram estabelecidas previamente para o gene *glnII*, (STEPKOWSKI et al., 2005), e para o gene ribossomal 16S (MENNA et al., 2006)

Após as amplificações por PCR, os produtos de amplificação foram purificados com o uso do Kit da Invitrogen “PureLink™ PCR purification”.

O resultado das amplificações e purificação foram verificados pela visualização dos fragmentos em gel de agarose a 1,0% e o padrão de peso molecular utilizado foi o “Low DNA Mass™” (Invitrogen-Life Technologies).

4.5 REAÇÕES DE PCR PARA O SEQÜENCIAMENTO

Para obter a seqüência completa do gene ribossomal 16S, cinco reações foram utilizadas (Menna et al., 2006), enquanto que, para o *glnII* apenas duas reações foram necessárias. As temperaturas e condições de amplificação para o sequenciamento foram as mesmas para todos os *primers*: desnaturação inicial a 95  C por 1 minuto, 40 ciclos com desnaturação a 95  C por 20 segundos, anelamento a 55  C por 30 segundos, e extensão a 60 C por 1 minuto; mantendo a temperatura final a 4  C.

As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 poços de fundo V. Para cada cultura bacteriana (80 ng de DNA por reação), foi feita uma mistura de 3  L de DNA purificado, 3  L de DYE (DYEnamic ETterminator reagent premix for the MegaBACE, Amershan Biosciences), e 3  L de cada *primer*, e as placas foram devidamente seladas.

Após a amplifica o foram adicionados 2  L de acetato de amônio estéril (7,5 M) e 65  L de etanol a 96% (temperatura ambiente). As placas foram seladas, homogeneizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos   temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente para secar. Depois da secagem foram adicionados 150  L de etanol, a placa foi selada, homogeneizada, centrifugada novamente a 4000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. A placa foi invertida em papel absorvente e centrifugada a 300 rpm por 25 segundos. O *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos, ou em estufa a 37 C por 15 minutos. A seguir, foi ressuscendido em 7  L de água milli-Q ou em “loading buffer for MegaBace” (70% formamida, 1 mM EDTA), e submetido   análise das seqüências em um sequenciador “MegaBACE 1000 DNA Analyses System” (Amershan Biosciences). Os parâmetros de eletroforese usados foram: Voltagem para inje o da amostra, 1KV; tempo de inje o da amostra, 40 segundos; voltagem de corrida, 5 KV; tempo da corrida, 240 minutos, sujeito a algumas altera es de acordo com os resultados.

4.6 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

As seqüências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas “phred” (Ewing et al., 1998), “phrap” versão 0,990722 (1993-2000) e “Consed” (GORDON et al., 1998). Para se obter uma alta qualidade destas seqüências, estas foram agrupadas em “contigs”, onde suas bases foram analisadas e validadas manualmente. Estas seqüências foram submetidas ao banco de dados GenBank (NCBI, 2008).

4.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado com o uso do programa ClustalX versão 1.83 (THOMPSON et al., 1997). Para as análises, as seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com as seqüências das estirpes tipo (“*type strain*”) (número de acesso do banco de dados em parênteses *Mesorhizobium amorphae* ACCC 19665^T (16S, DQ02832; *glnII*, EU518372), *Mesorhizobium tianshanense* USDA 3592^T (16S, AF041447; *glnII*, AF169579), *Mesorhizobium loti* USDA 3451^T (16S, X67229; *glnII*, não encontrado), *Mesorhizobium ciceri* USDA 3383^T (16S, U07934; *glnII*, AF169580), *Ensifer meliloti* USDA 1002^T (16S, X67222; *glnII*, DQ767676), *Ensifer fredii* USDA 205^T (16S, X67231; *glnII*, AF169591), *Rhizobium tropici* CIAT 899^T (16S, U89832; *glnII*, EU488791), *Rhizobium etli* CFN 42^T (16S, U28916; *glnII*, NC007761), *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (16S, U29386; *glnII*, EU155089), *Rhizobium mongolense* USDA 1844^T (16S, U89817; *glnII*, AY929453), *Rhizobium rhizogenes* ATCC 11325^T (16S, AY945955.1; *glnII*, não encontrado), *Rhizobium lusitanum* P1-7^T (16S, AY738130; *glnII*, EF639841), *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T (16S, U35000; *glnII*, AY599117.1), *Bradyrhizobium betae* PL74HG1^T (16S, AY372184; *glnII*, AB353733), *Bradyrhizobium yuamingense* CCBAU 10071^T (16S, AF193818; *glnII*, AY386780), *Bradyrhizobium canariense* BCC2^T (16S, AY577427; *glnII*, AY386762.1), *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T (16S, U69638; *glnII*, AF169582),

Bradyrhizobium liaoningense LMG 18230^T (16S, AF208513.1; *glnII*, AY386775.1), *Methylobacterium nodulans* ORS 2060^T (16S, AF220763; *glnII*, não encontrado).

Todas as seqüências foram obtidas através do banco de dados GenBank (NCBI, 2008). As árvores filogenéticas foram geradas com o uso do programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004). Para a construção das árvores foram realizadas as análises de “Neighbor Joining” (NJ) (Saitou & Nei, 1987). A análise de NJ foi realizada utilizando a correção de Kimura-2 (Kimura, 1980). Para dar um suporte estatístico para a árvore, esta foi avaliada com análise de “bootstrap” com 1000 repetições (Felsenstein, 1985). Como “outgroup” foi utilizada *Caulobacter crescentus* estirpe CB15 (genoma, AE005673).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 23 estirpes selecionadas entre os materiais previamente analisados por Menna et al. (2006) e Binde et al. (2009). Essas estirpes são autorizadas pelo Ministério da Agricultura para o uso em inoculantes comerciais brasileiros para 21 espécies de leguminosas.

As estirpes foram selecionadas por representar possíveis novas espécies, sendo que algumas apresentam discrepância de mais de 1,03% (correspondente a aproximadamente 15 nucleotídeos) na seqüência do gene do gene ribossomal 16S em relação à estirpe tipo (MENNA et al., 2006; BINDE et al., 2009). Sendo assim, inicialmente todas as seqüências do gene ribossomal 16S foram confirmadas e, em adição, foi realizada a análise da seqüência do gene *glnII*, visando conseguir uma melhor definição das espécies de rizóbios.

Três árvores filogenéticas foram construídas, uma com base no gene ribossomal 16S (Fig. 2), outra com base no gene *glnII* (Fig. 3) e uma terceira com base nas seqüências concatenadas dos genes 16S e *glnII* (Fig. 4).

A amplificação por PCR do gene *glnII* resultou em um fragmento de 570 pares de bases (pb), todavia, após o alinhamento das seqüências e a eliminação das extremidades, um fragmento de 480 pb foi utilizado para a análise, enquanto que o fragmento do gene ribossomal 16S analisado foi de 1460 pb.

As análises de 1460 pb do gene ribossomal 16S das estirpes estudadas mostrou uma identidade nas seqüências desses fragmentos variando de 90% a 99%, enquanto que, para o gene *glnII*, ela foi de 78% a 96%, confirmando que as seqüências do *glnII*, entre as espécies de rizóbios utilizadas neste estudo, apresentam variabilidade bastante superior à do gene ribossomal 16S. A análise dos 480 pb do *glnII* indicou que o gene possui 213 regiões variáveis (44%) e 177 de regiões de parsimônia informativa, ou seja (37%), enquanto que na análise com os 1460 pb do gene ribossomal 16S, apontou 313 regiões variáveis e 251 regiões de parsimônia informativa, representando de 21% e 17% do total de bases, respectivamente.

Na árvore filogenética do gene ribossomal 16S foram formados cinco grandes grupos, que ainda puderam ser subdivididos em dez subgrupos, em adição a algumas estirpes que ocuparam posições isoladas (Fig. 2). A árvore filogenética

construída com o gene *glnII* apresentou cinco grandes grupos subdivididos em oito subgrupos e com algumas estirpes ocupando posições isoladas (Fig. 3). Basicamente, os grandes grupos foram semelhantes entre os gêneros nas duas árvores, contudo, como a base de dados para o gene *glnII* é muito menor do que a do gene ribossomal 16S, não foram encontradas seqüências desse gene para *Methylobacterium nodulans*, *Rhizobium rhizogenes* ATCC11325^T e *Mesorhizobium loti* USDA 3451^T. Finalmente, a árvore construída com os dois genes concatenados apresentou quatro grupos principais, mas com 12 subgrupos (Fig. 4), evidenciando uma melhor divisão dos agrupamentos em relação às árvores construídas com os genes isolados.

Na árvore filogenética construída com o gene ribossomal 16S todas as SEMIAS representantes do gênero *Rhizobium* foram posicionadas no Grupo I, e quatro subgrupos foram observados (Fig. 2). No subgrupo I.I, a SEMIA 6423 foi agrupada com a estirpe tipo de *R. lusitanum*, com um suporte de *bootstrap* de 75% e esse grupo se uniu a *R. rhizogenes* com um *bootstrap* de 89%. Desse modo, a SEMIA 6423 apresenta maior semelhança genética com *R. lusitanum*, mas níveis mais elevados de *bootstrap* seriam necessários para confirmar essa posição taxonômica. Contudo, analisando a árvore filogenética do gene *glnII*, Grupo I, subgrupo I.III (Fig. 3), pode-se observar que a SEMIA 6423 obteve uma distância genética significativa dos grupos de estirpes tipos *R. lusitanum* e *R. rhizogenes*, formando um agrupamento isolado. Finalmente, na árvore com os genes concatenados (Fig. 4), essa estirpe ocupou uma posição isolada, indicando que a definição exata dessa estirpe requer o estudo adicional com mais genes.

Formando o subgrupo I.II do gene ribossomal 16S (Fig. 2), encontra-se a SEMIA 4088, simbiote de *Phaseolus vulgaris*, em um forte agrupamento com *R. tropici*, com *bootstrap* de 99%. Na análise do gene *glnII* (Fig. 3) e na árvore com os genes concatenados (Fig. 4) foi demonstrado um suporte de *bootstrap* de 100%. A análise das seqüências com os genes concatenados resultou em 99% de similaridade com a estirpe tipo de *R. tropici*, esse resultado pode ser obtido através da análise dos nucleotídeos (Tabela 3) utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON, 1994), programa o qual se permite obter a comparação exata do número de pares de bases idênticas entre as estirpes, e assim chegar a um nível de classificação com maior exatidão.

Na árvore filogenética do gene ribossomal 16S, no subgrupo I.III pode-se observar um agrupamento das SEMIAs 3026, 2082, 2051 e 3007 com a estirpe tipo de *R. leguminosarum*, com um *bootstrap* de 99% (Fig. 2). No subgrupo I.I do gene *glnII*, somente as SEMIAs 2082, 3026 e 3007 foram reunidas com a estirpe tipo de *R. leguminosarum*, também com um suporte de *bootstrap* de 99% (Fig. 3) e um resultado bastante semelhante foi observado na análise dos genes concatenados, com um *bootstrap* de 100% (Fig. 4). Contudo, considerando essas três SEMIAs, tanto na árvore do *glnII*, como naquela com os genes concatenados, fica evidenciado um outro agrupamento dentro desse grupo, reunindo as estirpes SEMIAs 3026 e 3007. Esse agrupamento era incipiente na árvore do gene ribossomal 16S e só foi evidenciado pela análise adicional do gene *glnII* que, quando teve suas seqüências alinhadas pelo programa CLUSTAL W, apresentou a SEMIA 2082, que é simbiote da leguminosa *Trifolium pratense*, com 0.5% de diferença no número de pb em relação à estirpe tipo de *R. leguminosarum*. A SEMIA 3026 é simbiote da leguminosa *Lens culinaris* e apresentou 2% de diferença em relação aos nucleotídeos da estirpe tipo. Por fim, a SEMIA 3007, que é simbiote de *Pisum sativum*, apresentou 1% de diferença de pb em relação à estirpe tipo (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos pela análise das seqüências dos genes concatenados, confirmando, portanto, os resultados obtidos com o gene ribossomal 16S, os indicativos de que as SEMIAs citadas pertencem à espécie *R. leguminosarum*. A discrepância que ocorreu no agrupamento do gene ribossomal 16S foi verificada com a estirpe SEMIA 2051, que tanto na análise do gene *glnII* (Fig. 3), como na análise dos genes concatenados (Fig. 4), ocupou uma posição isolada, embora próxima do agrupamento de *R. leguminosarum*.

A estirpe SEMIA 384, posicionada no subgrupo I.IV do gene ribossomal 16S (Fig. 2) é simbiote de *Vicia sativa*, foi isolada no Brasil e se encontra agrupada com *R. etli*, com um valor de *bootstrap* de 80%. Na árvore do gene *glnII* (Fig. 3) e na árvore concatenada (Fig. 4), esse agrupamento foi confirmado e teve um suporte *bootstrap* de 84% e 99%, respectivamente. Na análise das seqüências dos nucleotídeos dos genes concatenados usando o CLUSTAL W, a diferença da SEMIA 384 com *R. etli* foi de 2% de pb (Tabela 3), confirmando, portanto, o posicionamento taxonômico dessa estirpe.

Ainda dentro do grupo principal de estirpes do gênero *Rhizobium*, na árvore do gene ribossomal 16S (Fig. 2) estão as SEMIAs 6435, simbiote de

Gliricidia sepium e 6437, simbiote de *Adesmia latifolia*, ocupando posições isoladas. Analisando a árvore construída com base no gene *glnII* (Fig. 3), a SEMIA 6435 ainda se encontra isolada, enquanto que a SEMIA 6437 se encontra próxima ao agrupamento de *R. mongolense*, apontando para valores de diferenças de nucleotídeos, quando alinhadas pelo CLUSTAL W, de 7% ou seja 31 pb (Tabela 3), sendo considerados valores altos para se classificar uma espécie, demonstrando, portanto, que, essas SEMIAs podem ser classificadas somente em nível de gênero, ou seja *Rhizobium* sp. A análise da árvore concatenada (Fig. 4) apresentou um resultado semelhante, para a SEMIA 6435, e quando se analisa essas seqüências concatenadas, apresenta essa SEMIA com 3% de diferença em relação aos nucleotídeos e, em contrapartida, a SEMIA 6437 ainda na árvore concatenada (Fig. 4) se encontra agrupada com *R. mongolense*, com um valor de *bootstrap* de 76%, e com uma diferença de nucleotídeos quando alinhada ao CLUSTAL W, de 5% (Tabela 3), ou seja, mesmo formando o agrupamento, a correlação entre a SEMIA e a estirpe tipo é baixa, sugerindo a necessidade de análise de outros genes para uma classificação mais precisa.

Como base na análise do gene ribossomal 16S, Menna et al. (2006) classificaram a SEMIA 6161, posicionada no Grupo II e simbiote de *Prosopis juliflora*, como *Ensifer* sp. Neste estudo, pode-se verificar que houve maior similaridade dessa estirpe no gene ribossomal 16S com *E. meliloti* (Fig. 2), mas apresentando 1.35% de diferença em relação aos nucleotídeos quando comparados à estirpe tipo (CLUSTAL W) (Tabela 3). Na análise da árvore filogenética do gene *glnII*, a SEMIA 6161 também foi posicionada no Grupo II, agrupando-se com o gênero *Ensifer*, contudo, a estirpe não formou agrupamento com as estirpes tipo de *E. meliloti* ou *E. fredii* (Fig. 3). Contudo, na construção da árvore concatenada (Fig. 4), foi demonstrado que essa SEMIA também apresenta uma relação genética com a estirpe tipo de *E. meliloti*, com valores de similaridade, quando alinhada pelo CLUSTAL W com a estirpe tipo dessa espécie, de 95% dos nucleotídeos (Tabela 3). Pode-se sugerir, portanto, que a análise dos genes concatenados também não foi suficiente para sugerir uma classificação com mais exatidão para essa SEMIA.

O grupo III da árvore filogenética do gene ribossomal 16S (Fig. 2) está formado por quatro subgrupos; subgrupo III.I com a SEMIA 396, simbiote de *Cicer arietinum*, agrupada com *Mesorhizobium ciceri* e *M. loti*; subgrupo III.II, com a SEMIA 3012, simbiote de *Pisum sativum*, agrupada com *M. tianshanense*;

subgrupo III.III, com a SEMIA 6392, simbiote de *Chamaecrista ensiformis*, agrupada com *M. amorphae*; subgrupo III.IV, formado pelas SEMIAs 830 e 816. Na análise dos nucleotídeos das seqüências do gene *glnII* com o CLUSTAL W, apenas a SEMIA 396, subgrupo V.I, apresentou similaridade de nucleotídeos elevada, de 97%, enquanto que valores mais baixos foram observados com a SEMIA 3012 subgrupo V.II e a SEMIA 6392 subgrupo V.III, ambas com apenas 90% de similaridade (Tabela 3). Na análise na árvore filogenética dos genes concatenados (Fig. 4), os agrupamentos dessas três SEMIAs com as respectivas estirpes tipo foram confirmados, contudo, é importante observar que apenas a classificação da SEMIA 396 com *M. ciceri* pôde ser confirmada na análise dessas seqüências de nucleotídeos no programa CLUSTAL W, com 2% de diferenças em relação aos nucleotídeos (Tabela 3). Desse modo, a análise adicional de novos genes conservados pode trazer maior clareza para as SEMIAs 3012 e 6392.

Ainda no Grupo III, é importante comentar que as SEMIAs 816 e 830 ocuparam posições isoladas na árvore construída com o gene ribossomal 16S (Fig. 2), na árvore construída o gene *glnII* (Fig. 3) e na árvore construída com os genes concatenados (Fig. 4). A diferença observada, é que essas duas estirpes na árvore construída com o gene *glnII* formaram um grupo distinto das demais, o G. II. Na análise das seqüências pelo CLUSTAL W, essas SEMIAs formam um agrupamento entre elas com 100% de similaridade com o gene *glnII* e de 99% de similaridade entre elas, com as seqüências concatenadas. Sem dúvida, essas estirpes 816, simbiote de *Lotus corniculatus* e 830, simbiote de *Lotus glaber*, devem ser estudadas com mais detalhes, para se obter uma classificação mais precisa, utilizando outros genes conservados.

Na árvore com base no gene ribossomal 16S (Fig.2), a SEMIA 6407, simbiote de *Pithecellobium tortum* foi agrupada com a estirpe tipo de *M. nodulans*, uma bactéria diazotrófica simbiótica que é bastante diversa geneticamente dos demais rizóbios. Ainda em relação à seqüência do gene ribossomal 16S, o alinhamento no Blastn demonstrou um nível de 96% de similaridade com *M. mesophilicum*, classificada formalmente como *Pseudomonas mesophilica*; dessa forma, genes patogênicos e simbióticos dessa estirpe merecem ser estudados com mais detalhes. Contudo, tanto na árvore construída com base no gene *glnII* (Fig. 3), como na árvore concatenada (Fig. 4), a SEMIA 6407 se encontra isolada, visto que,

como já citado, não foi possível encontrar seqüência do *glnII* para a estirpe tipo de *M. nodulans*.

Finalizando, se encontra o quinto grupo principal do gene ribossomal 16S (Fig. 2), formado por estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, onde se encontram apenas dois subgrupos bastante distintos. No subgrupo V.I foram posicionadas as SEMIAs 696, simbiote de *Desmodium uncinatum* e a 6053, simbiote de *Clitoria ternatea*, que foram agrupadas com *B. elkanii* com um suporte de *bootstrap* de 99%. Em relação aos nucleotídeos da SEMIA 696, do gene ribossomal 16S, do gene *glnII* e seqüências dos genes concatenados alinhados com a estirpe tipo *B. elkanii* pelo CLUSTAL W (Tabela 3), observou-se o mesmo resultado para todas as análises, apenas 1% de diferença. Quando se analisa a árvore do gene *glnII* (Fig. 3), subgrupo IV.I e a árvore concatenada (Fig. 4), subgrupo IV.I, a SEMIA 696 obteve o mesmo agrupamento, com alto suporte de *bootstrap*, de 98% e 100%, respectivamente, o que também ocorreu na análise do gene ribossomal 16S; esses resultados sugerem que a SEMIA 696 deva ser classificada como *B. elkanii*. Já a estirpe SEMIA 6053, na árvore gerada com o gene *glnII* (Fig. 3), ela foi posicionada no subgrupo IV.I, distante da estirpe tipo de *B. elkanii* e, quando alinhada no programa CLUSTAL W com essa mesma estirpe tipo, apresentou, uma diferença em relação aos nucleotídeos de 4%, ou seja 18 pb (Tabela 3), e como pode ser observado na árvore construída com esse gene (Fig. 3), com um suporte de *bootstrap* de 95%. Finalmente, na árvore gerada com os genes concatenados (Fig. 4), a SEMIA 6053 foi posicionada no subgrupo IV.I e, em relação aos nucleotídeos desses genes concatenados alinhados com a estirpe tipo foi de 2%, ou 38 pb (Tabela 3), obtendo na árvore um suporte de *bootstrap* de 100% (Fig. 4). Assim, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles relatados por Menna et al. (2006), que sugerem que a SEMIA 6053 seja classificada como *B. elkanii*.

Na árvore construída com base no gene ribossomal 16S (Fig. 2), várias estirpes de *Bradyrhizobium* ocuparam posições isoladas (Fig. 2). Dentre essas estirpes, pode-se citar a SEMIA 6428, simbiote de *Acacia saligna*, isolada, mas, relacionada ao agrupamento de *B. elkanii* com um suporte de *bootstrap* de 100%. Na árvore com o gene *glnII* (Fig. 3) e na árvore concatenada (Fig. 4) essa SEMIA, mesmo se apresentando isolada, está muito próxima da estirpe tipo de *B. elkanii*, quando alinhada no CLUSTAL W e comparada com a estirpe tipo citada acima, apresenta valores relacionados aos pb de 5% para a árvore do gene *glnII*

(Tabela 3) um valor de similaridade elevado. Contudo, um fato interessante foi observado no alinhamento das seqüências dos genes concatenados com a estirpe tipo, pelo CLUSTAL W, onde a SEMIA 6428 diferiu em apenas 2% de pb (Tabela 3), podendo-se sugerir que a sua classificação como *B. elkanii*.

Formando um outro grupo isolado na árvore do gene ribossomal 16S (Fig. 2), ainda dentro do grupo principal de *Bradyrhizobium* se encontram as SEMIAS 6439, simbionte de *Arachis pintoii*, 6154, simbionte de *Stylosantes* sp. e 6396, simbionte de *Albizia pedicellaris*. Esse grupo se apresenta completamente isolado, e esses resultados foram confirmados quando alinhadas pelo programa CLUSTAL W com as respectivas estirpes tipo de *Bradyrhizobium* utilizadas nesse trabalho (Tabela 3). O resultado da análise da árvore construída gene *glnII* (Fig. 3) mostrou-se um pouco diferente, pois essas SEMIAS formaram alguns agrupamentos com as estirpes tipo de *B. yuanmingense*, *B. elkanii* e *B. canariense* respectivamente. Apesar da formação desses subgrupos, o valor de similaridade é muito baixo na análise das seqüências do gene *glnII* pelo programa CLUSTAL W (Tabela 3), os valores encontrados foram de 94% para a SEMIA 6439 com a estirpe tipo de *B. yuanmingense* com suporte de bootstrap observado na árvore (Fig. 3) de 69%, de 97% para SEMIA 6154 com a estirpe tipo de *B. elkanii*, com valor de bootstrap de 77% (fig. 3) e de 95% para a SEMIA 6396 com a estirpe tipo de *B. canariense*, com um suporte de bootstrap de 83% (Fig. 3). Um fato interessante ocorreu na análise da árvore com base nos genes concatenados (Fig. 4), em que a SEMIA 6396 foi agrupada com *B. canariense*; além disso, na análise das seqüências dos genes concatenados pelo CLUSTAL W, foi observada uma diferença de apenas 2% nos nucleotídeos (Tabela 3), dando maior suporte à classificação dessa estirpe como *B. canariense*. Por outro lado, na análise dos genes concatenados as SEMIAS 6439 e 6154 continuam sendo classificadas como *Bradyrhizobium* sp., merecendo pesquisas mais detalhadas.

Finalizando, ainda dentro do grupo de *Bradyrhizobium*, na árvore construída com as seqüências do gene ribossomal 16S, a estirpe SEMIA 6153, simbionte de *Leucena leucocephala*, foi posicionada no subgrupo V.III e se mostrou altamente relacionada com a estirpe tipo com qual foi agrupada, *B. liaoningense*, com um suporte de bootstrap de 95% e com apenas 0,24% de diferença em relação aos nucleotídeos, ou seja, apenas três pb quando analisada pelo programa CLUSTAL W (Tabela 3). Dando suporte para esses resultados, esse agrupamento

foi confirmado nas árvores construídas com os gene *glnII* e na árvore com os genes concatenados.

6 DISCUSSÃO

As estirpes utilizadas no trabalho são autorizadas pelo Ministério da Agricultura para utilização em inoculantes comerciais brasileiros para 21 espécies de leguminosas. Dados informativos sobre as estirpes identificadas como as mais eficientes para diversas leguminosas são de grande importância, visto que décadas de pesquisas foram investidas na identificação dessas estirpes. Contudo, embora exaustivos testes para avaliação da capacidade simbiótica das estirpes elite depositadas na Coleção SEMIA tenham sido conduzidos, em adição à definição básica de propriedades morfo-fisiológicas, a caracterização genética ainda era incipiente faltando, para muitas delas, um consenso taxonômico.

Atualmente, a análise do gene ribossomal 16S é indispensável em estudos de filogenia e taxonomia de microrganismos (GARRIT; HOLT, 2001; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005). Contudo, esse gene possui limitações devido a sua baixa taxa de evolução, resultando em um nível de conservação muito elevado (HERNANDEZ-LUCAS, et al., 2004). Em adição a isso, o gene também não está livre de eventos de transferência horizontal (LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005), desse modo, a análise exclusiva do gene ribossomal 16S pode conduzir, em alguns casos, a interpretações errôneas. Assim, cada vez mais é apontada a necessidade da análise de genes adicionais em estudos de taxonomia e filogenia microbiana (GEVERS, et al., 2005; MARTENS, et al., 2007). Devido a esse fato, e conforme foi evidenciado nos trabalhos de Menna et al. (2006) e Binde et al. (2009), muitas vezes não é possível diferenciar espécies de rizóbios com base apenas no gene ribossomal 16S, sendo um exemplo clássico as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006).

Neste estudo, a escolha de um segundo gene conservado para obter uma melhor definição das espécies recaiu no *glnII*, com base em outros estudos de utilização desse gene como ferramenta adicional em estudos filogenéticos e de taxonomia (TURNER; YOUNG, 2000; MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009). Nesses estudos, os dados obtidos têm demonstrado que o *glnII* é altamente conservado, mas que apresenta elevada informação genética e maior variabilidade de que o gene ribossomal 16S. Possibilitando melhorias nos estudos filogenéticos e taxonômicos e permitindo maior definição de novas espécies em rizóbios.

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima chave no metabolismo do nitrogênio, sendo também essencial para a síntese de proteínas. Assim, é natural que se considere que GS presentes nos procariotos seja, provavelmente, indispensável para todos esses organismos. No ponto de vista do papel central desempenhado pela GS, acredita-se que esse gene seja extremamente antigo. A descoberta do gene (GSII) da planta, sendo encontrado em bactérias simbióticas, levou à sugestão de que o gene seria oriundo de plantas hospedeiras, ocorrendo, provavelmente, uma transferência de genes (CARLSON; CHELM, 1986).

Mais tarde, esse conceito foi questionado, pelas novas descobertas de que a GSII, comumente encontrado em plantas e em rizóbios, pode também ser encontrada em bactérias não simbióticas e actinomicetos (BEHRMANN et al., 1990; KUMADA et al., 1990). Shatters e Kahn (1989) sugeriram que o ancestral comum do gene *glnII* (GSII) encontrado em rizóbios, possa ser anterior ao gene da planta em si, e têm argumentado contra a transferência horizontal de genes.

Atualmente, genes housekeeping como, *atpD*, *glnII* e *recA* têm sido amplamente utilizados como marcadores filogenéticos para diferenciar espécies de rizóbios (GEVERS et al., 2005; VINUESA et al. 2005; MARTENS et al. 2008).

Ribeiro et al. (2009) utilizou a metodologia de MLSA em seu estudo, utilizando vários genes “housekeeping”, entre eles: *dnaK*, *gltA*, *recA*, *rpoA*, *glnII* e gene ribossomal 16S e, em seguida, a seqüência desses genes foram concatenadas. O que pode ser observado nesse estudo, é que a árvore construída com o gene *glnII* está muito próxima dos resultados obtidos com a análise da árvore construída com esses genes concatenados. Pode se dizer, ainda, que a árvore construída com o gene *glnII*, dentre todas as árvores construídas com os genes “housekeeping” foi a que apresentou o melhor resultado quando comparada à árvore concatenada, sendo assim foi demonstrando que o gene *glnII* é uma excelente ferramenta para confirmar as relações filogenéticas e taxonômicas das estirpes estudadas.

No presente estudo, foram incluídos diversos gêneros de rizóbios, como *Rhizobium* (40%), *Bradyrhizobium* (29%), *Mesorhizobium* (21%), *Ensifer* (5%) e *Methylobacterium* (5%). As estirpes foram obtidas a partir do isolamento de nódulos coletados de diversas leguminosas e, após serem identificadas como as mais eficientes em fixar nitrogênio com as respectivas leguminosas hospedeiras, passaram a ser recomendadas como inoculantes comerciais. O *primer* utilizado nesse estudo para amplificação do gene *glnII*, embora permitindo somente a

amplificação parcial do gene, demonstrou um grande resultado, e foi uma tentativa bem sucedida para todos os isolados, visto que, genes de espécies tão distintas foram amplificados.

Das estirpes analisadas nesse trabalho, as quais estão distribuídas em cinco gêneros, 85% foram obtidas de solos brasileiros, enquanto que as demais foram obtidas de regiões diversas, a Austrália, México e Malásia.

A árvore filogenética do *glnII* exibiu boa resolução, assim como a árvore dos genes concatenado, como também ocorreu nos estudos de Ribeiro et al. (2009). Este fato ocorreu em todos os agrupamentos formados dos gêneros de *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*, com resultados melhores do que mostrado pela filogenia do gene ribossomal 16S. Os resultados obtidos para essas estirpes analisadas foram também evidenciados pelo programa CLUSTAL W, o qual apresentou importantes informações para uma classificação com mais exatidão para essas SEMIAs, principalmente quando se analisou as seqüências dos genes concatenados o qual resultou em aproximadamente 1940 pb.

Algumas estirpes que na análise exclusiva do gene ribossomal 16S se apresentavam agrupadas com uma estirpe tipo específica, apresentaram um resultado diferente com a análise de um gene adicional (*glnII*) e um resultado ainda mais interessante foi obtido na análise dos genes concatenados (16S + *glnII*). Como exemplo, no grande grupo de *Rhizobium* a SEMIA 6423, com a análise do gene ribossomal 16S, estava intimamente relacionada com a estirpe tipo de *R. lusitanum* P1-7 e, no entanto, com o gene *glnII* e a árvore dos genes concatenados, a estirpe ocupou uma posição isolada. Esses resultados, portanto, dão suporte às observações de Gevers et al. (2005), de que o gene ribossomal 16S, mesmo apresentando 99% de similaridade de suas seqüências quando alinhado ao CLUSTAL W com uma estirpe tipo específica, poderia conduzir, em alguns casos, a falsas interpretações. Resultados semelhantes foram observados em outros grupos deste estudo.

De acordo com Hirsch e colaboradores (2001), algumas espécies de *Rhizobium* possuem hospedeiro específico, como é o exemplo de *R. leguminosarum* bv. trifolii, considerado específico de trevo (*Trifolium* spp). O que pode ser observado nesse trabalho é que a SEMIA 2051, que foi classificada por Menna et al. (2006) como *R. leguminosarum*, é simbiote de *Trifolium vesiculosum*; na análise do gene *glnII* e dos dois genes concatenados, essa SEMIA se encontra isolada da estirpe

tipo de *R. leguminosarum* USDA 2370, podendo ser sugerido, portanto, que a SEMIA 2051, em trabalhos futuros seja reclassificada como *R. leguminosarum* bv. trifolii.

É importante estabelecer um melhor entendimento da natureza desses microrganismos (taxonomia, diversidade e distribuição), das associações entre esses rizóbios com as leguminosas e sua capacidade de FBN e, através disso, selecionar estirpes elite para cada leguminosa hospedeira de interesse para que sejam comercializados inoculantes industriais (HUNGRIA et al., 2005).

Segundo Weir (2006) os gêneros de leguminosas nativas têm co-evoluído com as bactérias diazotróficas simbiotes há milhões de anos, inclusive resultando em novas espécies. Em contrapartida, a origem dos rizóbios que passaram a nodular leguminosas exóticas introduzidas é desconhecida. Estudos anteriores de Perret et al. (2000) demonstraram que estirpes de rizóbios são diferentes em relação à especificidade da planta hospedeira. Algumas estirpes (por exemplo, *E. fredii* NGR234) são promíscuas, chegando a formar associações com 232 espécies e 112 gêneros de leguminosas (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999; HIRCH et al., 2001; SALDAÑA et al., 2003), enquanto outras parecem ter um hospedeiro específico. Nesse trabalho, assim como Menna et al., (2006) e Binde et al., (2009) pode-se observar que várias estirpes estudadas possuem uma ampla gama de hospedeiros e, aparentemente, não foi encontrada nenhuma evidência da correlação evolutiva dessas bactérias com suas respectivas plantas hospedeiras.

Existe uma diversidade muito grande em relação aos rizóbios e suas plantas hospedeiras, alguns exemplos são demonstrados por trabalhos de Laguerre et al. (1997) e Kan et al. (2007), dados desses autores demonstram que a leguminosa *Oxytropis*, planta nativa do oeste do Canadá e tóxica para o pastejo dos animais são noduladas por espécies distintas de rizóbios, entre as espécies estão *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* e *Ensifer*. Os autores ainda demonstram que as espécies que nodulam essa leguminosa no Canadá são completamente diferentes das espécies que as nodulam na China. Ficando evidente, portanto que as populações de rizóbios em associações com *Oxytropis* são diferentes nos dois países.

Perret et al. (2000) colocam que, geralmente, as espécies hospedeiras herbáceas de rizóbios são mais promíscuas do que as de leguminosas arbóreas. Chen et al. (2005). e Kuykendall et al. (2005), colocam que apesar de mais

de um século de investigação, um fato interessante é que várias espécies de rizóbios são conhecidas para algumas centenas de espécies de leguminosas (de um total de 18.000), sendo a maioria das culturas, forrageiras ou de leguminosas para grão.

O que se pode observar na vasta Coleção de Culturas SEMIA e nas estirpes utilizadas nesse trabalho (Tabela 1), é que, em muitos casos, rizóbios pertencentes a mesma espécie podem nodular leguminosas bastante distintas, sendo, portanto, de extrema importância às pesquisas sobre as interações entre os hospedeiros e esses rizóbios.

Em estudos filogenéticos, o gene *glnII* demonstrou ser uma ferramenta, útil, por ser uma molécula altamente conservada e com uma taxa de evolução mais elevada quando comparado ao gene ribossomal 16S (PESOLE et al., 1991; PESOLE et al., 1995; TURNER; YOUNG, 2000; Lloret; MARTINEZ-ROMERO, 2005). Dados de parsimônia informativa obtidos neste trabalho, bem como no estudo de Ribeiro et al. (2009) confirmam a elevada diversidade e a viabilidade de utilização do gene *glnII* em estudos filogenéticos, em complementação ao gene ribossomal 16S.

Neste estudo, após a análise das árvores filogenéticas obtidas com as seqüências do gene ribossomal 16S, do gene *glnII* e das seqüências concatenadas (16S+*glnII*) foi possível observar a presença de um grupo bem definido de bactérias do gênero *Rhizobium*, denominado Grupo I. Nesse grupo, a análise dos genes concatenados evidenciou, em vários casos, uma melhor definição das espécies e agrupamentos, em função da variabilidade do gene *glnII*.

Por um longo tempo, somente espécies de *Medicago*, *Melilotus* e *Trigonella* foram apresentadas como plantas hospedeiras de *E. meliloti*. Recentemente, algumas bactérias altamente eficientes na FBN foram isoladas de *Phaseolus vulgaris* na Tunísia e foram classificadas como um novo biovar da estirpe de *E. meliloti* (bv. *mediterranense*) (MNASRI et al., 2007). Alguns genes de nodulação da estirpe de *E. meliloti* que foram encontrados nodulando o feijoeiro foram analisados por Sui et al. (2009) e se mostraram completamente diferentes dos genes analisados em estirpes de *R. etli* e *E. meliloti* encontrados em outras plantas hospedeiras. É possível que estirpes de *E. meliloti* isoladas da leguminosa *Oxytropis* analisadas nos estudos de Sui et al. (2009), formem um novo biovar de *E. meliloti*, pois também possuem genes de nodulação diferentes de outras espécies.

No agrupamento de bactérias do gênero *Ensifer* e no agrupamento de bactérias do gênero *Mesorhizobium*, os resultados obtidos tanto pela árvore construída com o gene *glnII* (Fig. 3), como a árvore construída pelos genes concatenados (Fig. 4), demonstraram resultados semelhantes à árvore construída com o gene ribossomal 16S (Fig. 2). A SEMIA 6161 apresentou uma diferença considerável em todas as análises em relação às estirpes tipo utilizadas, tanto para *E. meliloti* quanto para *E. fredii*, de acordo com os nossos resultados e observando trabalhos analisados por Sui XinHua, et al. (2009) essa SEMIA poderia representar uma nova espécie de *Ensifer*. Em relação às SEMIAs 6392 agrupadas com *M. amorphae* e 3012 agrupada com *M. tianshanense*, de acordo com os resultados na construção da árvore com os genes concatenados e com os resultados apresentados pelo programa CLUSTAL W, demonstra essas SEMIAs distantes de qualquer estirpe tipo do gênero de *Mesorhizobium*, diferentemente dos resultados sugeridos por Binde et al. (2009). Em relação a esses subgrupos o que pode ser sugerido é que essas estirpes representem novas espécies de *Mesorhizobium*. Segundo Kuykendall et al. (2003) não é possível distinguir estirpes nativas de *R. leguminosarum* encontrados nos solos da Nova Zelândia de estirpes utilizadas como inoculantes comerciais nesse mesmo solo, pois foi observado pelo autor que essas estirpes de *R. leguminosarum* provavelmente adquiriram genes individuais ou até mesmo uma ilha simbiótica completa através de simbiose com espécies de *Mesorhizobium* sp, apresentando dados relacionados a promiscuidade entre as estirpes de *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. O que se sugere é que o grande grupo principal de *Mesorhizobium* mereça atenção especial neste trabalho.

Foi demonstrado no trabalho de Kwon et al. (2005) que a construção da árvore baseada no gene ribossomal 16S e seqüências da região ITS das estirpes de *Mesorhizobium* foram muito conflituosas devido à fraca resolução taxonômica das seqüências do gene ribossomal 16S e da baixa confiança no seu dendrograma. Os autores sugerem que vários isolados dentro do gênero de *Mesorhizobium* sejam re-analisados, pois podem representar novos táxons. Neste trabalho, a filogenia do gene *glnII* (Fig. 3) apoiou uma estreita relação filogenética entre as SEMIAs 816 e 830, que são estirpes classificadas como *Mesorhizobium* sp por Menna et al. (2006), com o agrupamento de *Rhizobium*; essas estirpes se encontram isoladas do agrupamento de *Mesorhizobium* na árvore construída com esse gene. Um detalhe, ainda dentro do gênero de *Mesorhizobium* observado por Turner e Young (2000), foi

o de que na análise do gene *glnII* a estirpe tipo de *M. huakuii* foi separada do gênero de *Mesorhizobium*, levando a um agrupamento próximo a *Rhizobium*, o que levou os autores a sugerirem que tenha ocorrido a transferência horizontal de genes. Esse também pode ter sido o caso para as SEMIAs 816 e 830, pois na análise do gene ribossomal 16S foram posicionadas no agrupamento de *Mesorhizobium*, contrastando com o resultado nas análise do *glnII*.

Finalmente, pode se observar o grupo principal formado por estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, agrupamento que demonstrou alta variabilidade de resultados com os dois genes analisados, o gene ribossomal 16S (Fig. 2) e o gene *glnII* (Fig. 3). Nesse caso, na análise dos genes concatenados, foi possível obter uma melhor resolução dos resultados. Pode se observar, na análise do gene ribossomal 16S, que as estirpes tipo de *B. japonicum* USDA 6, *B. liaoningense* LMG 18230 e *B. canariense* BCC2, ficaram muito próximas, e a similaridade das seqüências dessas três espécies foram anteriormente relacionadas (ZAKHIA et al., 2001; WILLEMS et al., 2001; VINUESA et al., 2005). O que pode ser observado neste trabalho é que quando se analisa a árvore construída com os dois genes concatenados, essas estirpes tipo estão distanciadas geneticamente, provavelmente pela maior variabilidade do gene *glnII* (TURNER; YOUNG, 2000; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005). Embora a alta diversidade na morfologia, fisiologia e propriedades genéticas dentro das estirpes de *Bradyrhizobium* tenham sido demonstradas, essas diferenças freqüentemente não são detectadas na análise do gene ribossomal 16S (VINUESA et al., 1998; BARRERA et al., 1997; MOLOUBA et al., 1999; CHEN et al., 2000; VAN BERKUM; FUHRMANN 2000; WILLEMS et al., 2001; WILLEMS et al., 2003). Desse modo, a análise do gene *glnII* se mostrou bastante interessante, possibilitando a obtenção de uma melhor definição das espécies que ocupam posição isolada nesse grande agrupamento de *Bradyrhizobium*. Assim, estudos utilizando outros marcadores, tais como análises de diversos genes podem chegar a conclusões mais precisas para as estirpes com posicionamento pouco claro dentro do gênero *Bradyrhizobium* (STEPKOWSKI et al., 2003; VINUESA et al., 2005; GERMANO et al. 2006; MENNA et al., 2009).

Os dados obtidos nesse trabalho demonstram que as seqüências do gene *glnII*, juntamente com os dados das seqüências do gene ribossomal 16S, constituem uma poderosa ferramenta em estudos filogenéticos, principalmente quando uma coleção de distintos gêneros de rizóbios são analisados sendo, assim,

de grande utilizada para estimar relações de evolução entre esses grupos. Esses dados evidenciam que, quando comparados aos resultados alcançados somente com as seqüências do gene ribossomal 16S, houve um incremento no poder discriminatório e, assim, o gene *glnII* pode ser utilizado em complementação ao gene ribossomal 16S em estudos filogenéticos e de taxonomia de rizóbios. Nossos resultados sugerem, portanto, que os 480 pb de seqüências do gene *glnII* poderiam ser utilizados como um excelente marcador adicional taxonômico de rizóbios e espécies afins (em alternativa ou em conjunto a filogenia do gene ribossomal 16S).

Tabela 3 – Informação sobre as seqüências do 16S rRNA, *glnII* e as seqüências concatenadas das estirpes em estudo.

| Estirpe SEMIA | 16S rRna | | | <i>glnII</i> | | | 16S rRNA + <i>glnII</i> | | Proposta para posição taxonômica |
|---------------|--------------------|--|------------------------------------|--------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | No. Acesso GenBank | Identidade com a estirpe-tipo ^a | Diferença em pb (%) ^{b,c} | No. Acesso GenBank | Identidade com estirpe-tipo ^a | Diferença em pb (%) ^{b,c} | Identidade com estirpe-tipo ^a | Diferença em pb (%) ^{b,c} | |
| 384 | AY904730 | 1434/1440 | 14 (1,0) | GQ160496 | 453/479 | 26 (6,0) | 1905/1941 | 36 (2,0) | <i>Rhizobium etli</i> |
| 396 | AY904731 | 1457/1462 | 5 (0,4) | GQ160515 | 466/481 | 15 (3,0) | 1915/1952 | 37 (2,0) | <i>Mesorhizobium ciceri</i> |
| 696 | AY904736 | 1441/1449 | 14 (1,0) | GQ160506 | 477/481 | 4 (1,0) | 1929/1951 | 22 (1,0) | <i>Bradyrhizobium. Elkanii</i> |
| 816 | AY904737 | 1436/1458 | 21 (1,5) | GQ160514 | 419/471 | 52 (12,0) | 1862/1935 | 73 (4,0) | <i>Mesorhizobium sp</i> |
| 830 | AY904738 | 1432/1455 | 23 (1,6) | GQ160504 | 418/471 | 53 (12,0) | 1853/1937 | 84 (5,0) | <i>Mesorhizobium sp</i> |
| 2051 | AY904740 | 1434/1441 | 7 (0,5) | GQ16013 | 444/480 | 36 (8,0) | 1890/1942 | 52 (3,0) | <i>Rhizobium sp</i> |
| 2082 | FJ025094 | 1434/1442 | 8 (0,6) | GQ160494 | 478/480 | 2 (0,5) | 1935/1943 | 8 (0,4) | <i>Rhizobium leguminosarum</i> |
| 3007 | AY904742 | 1431/1443 | 12 (0,9) | GQ160503 | 476/480 | 4 (1,0) | 1919/1944 | 25 (1,3) | <i>Rhizobium leguminosarum</i> |
| 3012 | FJ025121 | 1435/1443 | 8 (0,6) | GQ160512 | 435/480 | 45 (10) | 1888/1944 | 56 (3,0) | <i>Mesorhizobium sp</i> |
| 3026 | FJ025093 | 1436/1441 | 5 (0,4) | GQ160502 | 474/480 | 6 (1,3) | 1926/1942 | 16 (1,0) | <i>Rhizobium leguminosarum</i> |
| 4088 | EF054889 | 1431/1443 | 12 (0,9) | GQ160511 | 480/480 | 0 (0,0) | 1931/1944 | 13 (0,6) | <i>Rhizobium tropici</i> |
| 6053 | AY904745 | 1443/1453 | 10 (0,7) | GQ160501 | 462/480 | 18 (4,0) | 1910/1948 | 38 (2,0) | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> |
| 6153 | FJ025097 | 1444/1447 | 3 (0,24) | GQ160510 | 454/480 | 26 (6,0) | 1922/1948 | 26 (1,4) | <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> |

| | | | | | | | | | |
|------|----------|-----------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|----------|--|
| 6154 | FJ025100 | 1446/1456 | 10 (0,7) | GQ160500 | 468/480 | 12 (2,9) | 1898/1954 | 56 (3,0) | <i>Bradyrhizobium</i> sp |
| 6161 | AY904763 | 1427/1444 | 18 (1,35) | GQ160509 | 436/479 | 43 (9,0) | 1861/1945 | 96 (5,0) | <i>Ensifer</i> sp |
| 6392 | FJ025126 | 1438/1444 | 6 (0,45) | GQ160499 | 435/480 | 45 (10,0) | 1892/1945 | 53 (3,0) | <i>Mesorhizobium</i> sp |
| 6396 | FJ025099 | 1413/1456 | 43 (3,1) | GQ160495 | 458/480 | 22 (5,0) | 1912/1949 | 37 (2,0) | <i>Bradyrhizobium</i> <i>canariense</i> |
| 6407 | FJ025133 | 1361/1442 | 79 (5,8) | GQ160508 | 449/480 | 31 (7,0) | 1845/1954 | 109(6,0) | <i>Methylobacterium</i> sp |
| 6423 | FJ025132 | 1437/1339 | 2 (0,14) | GQ160507 | 433/460 | 27 (6,0) | 1885/1939 | 54 (3,0) | <i>Rhizobium</i> sp |
| 6428 | FJ025106 | 1440/1448 | 8 (0,59) | GQ160498 | 459/480 | 21 (4,8) | 1918/1949 | 37 (2,0) | <i>Bradyrhizobium</i> <i>elkanii</i> |
| 6435 | FJ025130 | 1421/1439 | 18 (1,35) | GQ160505 | 449/480 | 31 (7,0) | 1884/1939 | 55 (3,0) | <i>Rhizobium</i> sp |
| 6437 | FJ025118 | 1406/1441 | 35 (2,5) | GQ160497 | 418/480 | 62 (15,0) | 1845/1942 | 97 (5,0) | <i>Rhizobium</i> sp |
| 6439 | FJ025098 | 1429/1447 | 18 (1,35) | GQ160516 | 454/481 | 27 (6,0) | 1887/1949 | 52 (3,0) | <i>Bradyrhizobium</i> sp |

a- Identidade com a estirpe tipo mais próxima.

b- Diferenças nos números de nucleotídeos em relação a estirpe tipo.

c- Porcentagem das diferenças dos nucleotídeos em relação à similaridade com a estirpe tipo



Figura.2 – Filogenia das árvores baseada no gene ribossomal 16S, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. As árvores foram geradas usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”.

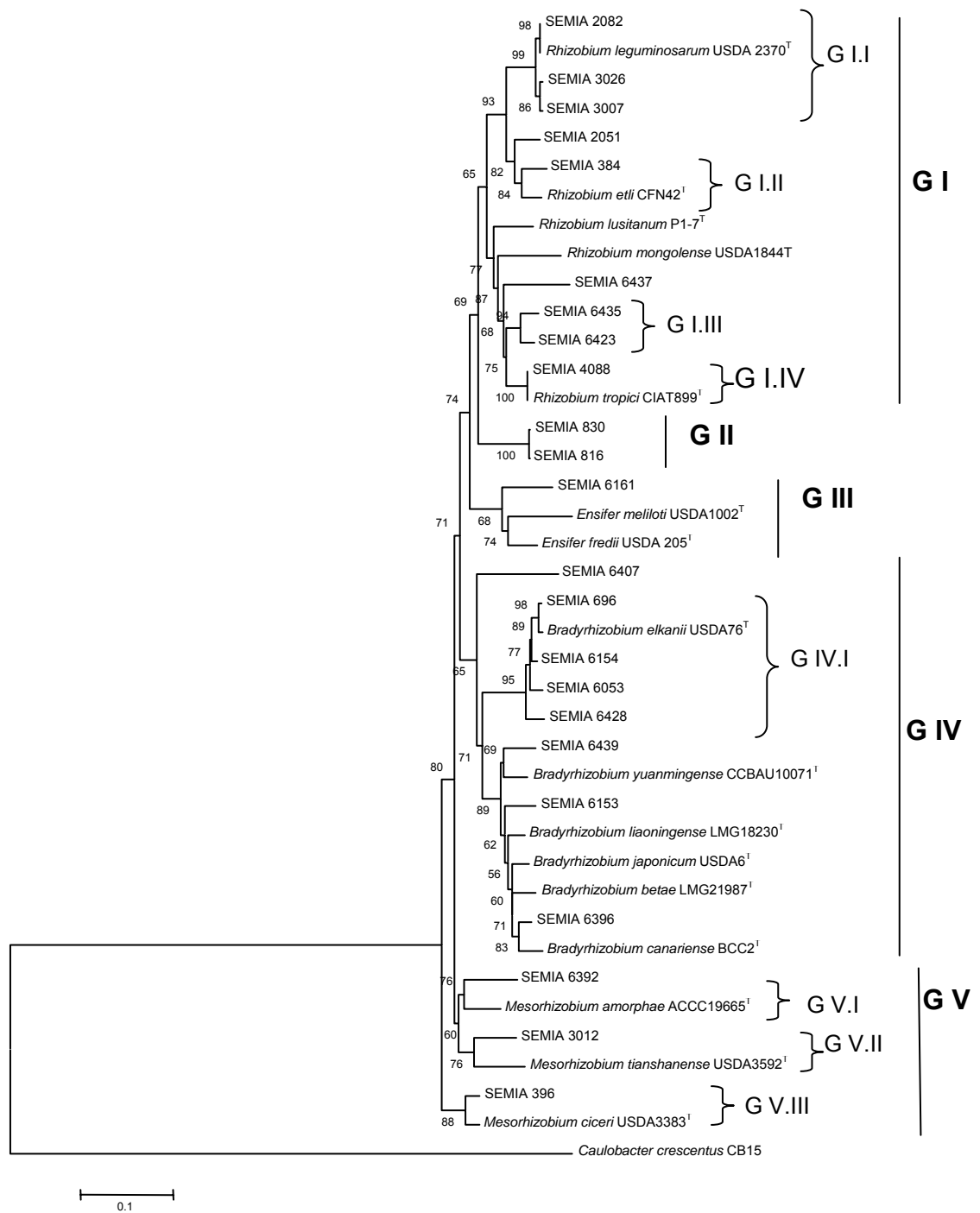


Figura.3 – Filogenia das árvores baseada no gene *glnII*, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. As árvores foram geradas usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”.

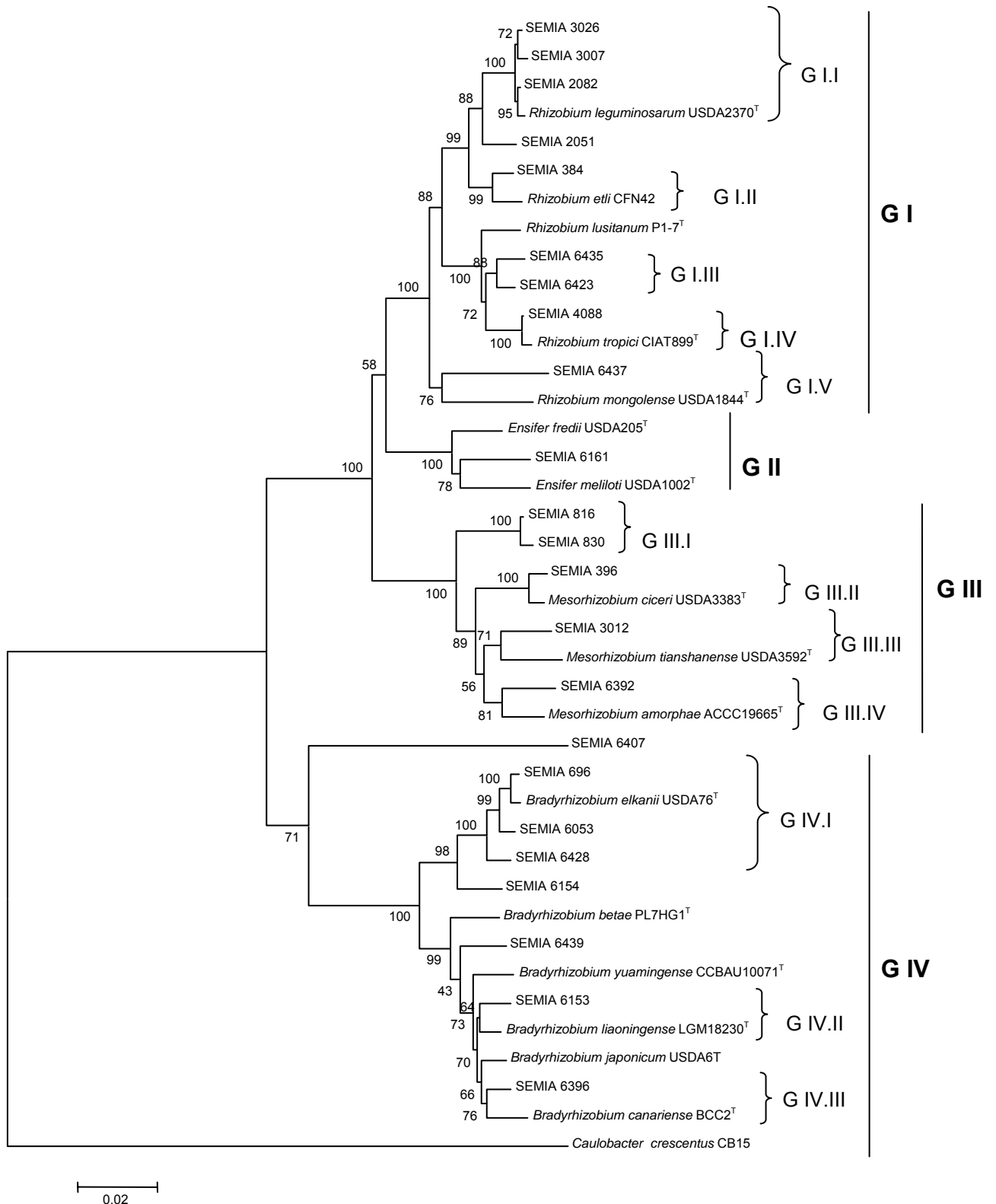


Figura 4 – Filogenia das árvores baseada no gene ribossomal 16S concatenado ao gene *glnII*, com vinte e três estirpes recomendadas para o uso de inoculantes comerciais no Brasil, para diferentes leguminosas. Utilizando em conjunto, na análise, estirpes de referência “type strain” e como outgroup *Caulobacter crescentus* CB15. As árvores foram geradas usando a versão MEGA 4.0 e como modelo algorítmico o método “Neighbour-Joining”.

REFERÊNCIAS

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K., **The leguminosae: a source book of characteristics, uses, and nodulation.** Madison, USA: University of Wisconsin Press, 1981.

ARÁUJO, R.S. Limitações para o estabelecimento de novas estirpes de *Rhizobium* no solo – progressos nos estudos sobre competitividade nodular. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO A.; ANDRADE, D.S. (Eds). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI.** Londrina: Embrapa CNPSO/IAPAR, 1994. p.55-56.

BALA, A; MURPHY, P.; GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p. 917-930. 2003.

BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; I. HERNÁNDEZ-LUCAS, DÁVILA, G.; VAN BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.47, p. 1086–1091, 1997.

BEHRMANN, I.; HILLEMANN, D.; PUHLER, A.; STRAUCH, E.; WOHLLEBEN, W. Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (glnII) encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. **The Journal of Bacteriology**, v.172, p.5326-5334, 1990.

BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based em the sequencing of the 16S rRNA gene of fifty-four elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009, (“in press”).

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey’s manual of systematic bacteriology** 2nd ed., v. 1. USA: Springer-Verlag, 2001.

BRENNER, S.; MILLER, J. H. **Encyclopedia of genetics.** London, UK: Academic Press. 2002.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil** , v.174, p.143-180, 1995.

BROUGHTON, W.J. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*, **Journal of Bacteriology** v.185, p.2975-2979, 2003.

BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.305-311, 1999.

CARLSON, T.A.; CHELM, B.K. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **Nature**, v.322, p.568-570, 1986.

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.

CHEN, L.S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay, **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5099-5103, 2000.

CHENG, T.C. Is parasitism symbiosis? A definition of terms and the evolution of concepts. Coexistence or conflict? In: TOF, C.A.; AESCHIMANN, A.; BOLIS, L. (Eds). **Parasite host associations**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p.15-36.

CHEN, W.M.; LAEVENS, S.; LEE, T.M.; COENYE, T.; de VOS, P., MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species *y sputum* of cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1755, 2001.

CHEN, W.M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BENA, G.; BOVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **Journal Bacteriology**, v.185, p.7266-7272, 2003.

CHEN, W.X.; WANG, E.T.; KUYJENDALL, L.D. Genus VI. *Mesorhizobium* Jarvis, van Berkum, Chen, Nour, Fernandez, Cleyet-Marel and Gillis 1997, 897VP. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, R.K.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M. (Eds.) **Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York, Springer, v.2 of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

CHIURAZZI, M.; MEZA, R.; LARA, M.; LAHM, A.; DEFEZ, R.; IACCARINO, M.; ESPIN, G. The *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. **Gene**, v.119, p1-8, 1992.

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.

COHN, F. Untersuchungen über bacterien. II. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, v.1, p.127–224, 1872.

CONN, H.J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v.44, p.353–360, 1942.

CULLIMORE, J.V.; MOULIN, L.; MANGIN, B.; DENARIE, J.; BOIVIN, C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. **Acta Biochemical Polonica**, v.48, p.359-365, 2001.

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

DE KRUIF, P. **Microbe hunters**. New York, N.Y.; Harcourt, Brace & Co., 1926.

DOBERT, R.C.; BRIEL, B.T.; TRIPLETT, E.W. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.7, p.564-572, 1994.

DOWNIE, J.A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.387-402.

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

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M. (Eds.), **Biologia dos solos do cerrados**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1997. p.17-67.

EISEN, J.A. The *recA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecA and 16S r RNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.1105-1123. 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.186-194, 1998.

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.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.911-920, 2003.

FORTES, J.L.O.; BALIEIRO, F.C.; FRANCO, A.A. Leguminosas arbóreas como agentes de recuperação de áreas degradadas. In: MOURA, E.G. (Coord.). **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil: atributos; alterações; uso na produção familiar**. 1.ed. São Luiz: Uema, 2004. p.101-132.

FRANK, B. Ueber die pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p.332–346, 1889.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**, Madison, USA: Univ. Wisconsin Press, 1932.

FREIBERG, A.; PERRET, X.; BROUGHTON, W.J.; ROSENTHAL, A. Sequencing the 500 Kb GC – rich symbiotic replicon of *Rhizobium* sp. NGR 234 using dye terminators and a thermostable “sequenase”: a beginning. **Genome Research**, v.6, p.590-600, 1996.

Garrity, G.M. & Holt, J.G. The road map to the manual, In: Boone, D.R.; Castenholz, R.W. (Eds.), **Manual of Systematic Bacteriology, the Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**, Second ed, Springer, New York, USA, 2001, p. 119–166.

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

GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legumes 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.

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.

GONZÁLES, V.; BUSTOS, P.; RAMÍREZ-ROMERO, M.A.; MEDRANO-SOTO, A.; SALGADO, H.; HERNÁNDEZ-GONZÁLES, I.; HERNÁNDEZ-CELIS, J.C.; QUINTERO, V.; MORENO-HAGELSIEB, G.; GIRARD, L.; ROGRIGUEZ, O.; FLORES, M.; CEVALLOS, M.A.; COLLADO-VIDES, J.; ROMERO, D.; DÁVILA, G. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN 42 and its relation to other symbiotic genome compartments. **Genome Biology**. v.4, R36, 2003.

GOODFELLOW, M. Microbial systematics: background and uses. In: PRIEST, F.G. & GOODFEILOW, M. (Eds). **Applied Microbial Systematics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000.

GOODMAN, H.J.K.; WOODS, D.R. Cloning and nucleotide sequence of the *Butyrivibrio fobrisolvans* gene encoding a type III glutamine synthetase. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p.1487-1493, 1993.

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

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.

GRAHAM, P.H. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: JAMES, E.K.; SPRENT, J.; DILWORTH, M.J.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. The Netherlands: Springer, 2006. v.7, p.23-28.

GUAN, S.H.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; LU, Y.L.; YAN, X.R.; ZHANG, X.X.; CHEN W.X. *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2646-2653, 2008.

HAN, T.X.; HAN, L.L.; WU, L.J.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; GU, J.G.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov. isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2610-2618, 2008.

HERENDEEN, P.S.; CREPET, W.L.; DILCHER, D.L.; The fossil record. In: HERENDEEN, P. S.; DILCHER D.L. (Eds). **Advances in legume systematics**. v.4. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1992. pp. 303-306.

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.

HILL, R.T.; PARKWER, J.R.; GOODMAN, H.J.K.; JONES, D.T.; WOODS, D.R. Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.3271-3279, 1989.

HIRSCH, A.M.; LUM, M.R.; DOWNIE, J.A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? **Plant Physiology**, v.127(4), p.1484–1492, 2001.

HUGENHOLTZ P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998a.

HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, K.L.; PACE, N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.366-376, 1998b.

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, 1994. p.9-89.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro: In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa CPAC, 1997. p.189-225.

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

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Springer, Dordrecht: The Netherlands, 2005. p. 223-254.

IWABE, N.; KUMA, K.L.; HASEGAWA, O. S.; MIYATA, T. Evolutionary relationships of archaeobacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.9355-9359, 1989.

JANDA, J.M.; ABBOT, S.L. Bacterial identification for publication: When is enough enough **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1887-1891, 2002.

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.

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**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.

KAN, F.L.; CHEN, Z.Y.; WANG, E.T. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v.188, p.103-115, 2007.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKASAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v.7, p.331-338, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S.; Complete genome sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. **DNA Research**, v.9, p.189-197, 2002.

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

KUMADA, Y.; TAKANO, E.; NAGAOKA, K.; THOMPSON, C. Streptomyces hygroscopicus has two glutamine synthetase genes. **The Journal of Bacteriology**, v.172, p.5343-5351, 1990.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

KUYKENDALL, L.D.; HASHEM, F.M.; WANG, E.T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, New York, N.Y. Springer-Verlag, 2003, v.2, 2nd edition.

KUYKENDALL, L.D.; YOUNG, J.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus I. *Rhizobium* Frank 1889, 338^{AL}. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, R.K.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M. (Eds.) **Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York, Springer, 2005, v.2, 2nd edition.

KWON, S.W.; PARK, J.Y.; KIM, J.S.; KANG, J.K.; CHO, Y.H.; LIM, C.K.; PARKER, M.A.; LEE, G.B. **Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.55, p.263-270, 2005.

LAGUERRE, G.; VAN BERKUM, P.; AMARGER, N. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*, p.63, p.4748-4758, 1997.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROWN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, v.147; p.981-993, 2001.

HAN, L.L.; WANG, E.T.; HAN, T.X.; LIU, J.; SUI, X.H.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil*, 2009 ("in press").

ILDIS (International Legume Database & Information Service) Disponível em <http://www.ildis.org>, acesso em abril de 2005.

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

LONG, S.R. *Rhizobium* legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, v.56; p.203-214, 1989.

MADIGAN, M.T.; MARTINIKO, J.M.; PARKER, J. In: **Brock biology of microorganisms**. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, Upper Saddle River 2000.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2006. Instrução Normativa Nº 10, de 21 de março de 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16735>>, acesso em abril 2006.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; VOS, DE P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. A Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.489-509, 2007.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, v.161, p.11-20, 1994.

MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H., COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J.A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.102-112, 2006.

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.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V., HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, 2009 ("in press")

MNASRI, B; MRABET, M; LAGUERRE, G; Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. **Archives of Microbiology**, v.85, p.187: 79, 2007.

MOLOUBA, F.; LORQUIN, J.; WILLEMS, A.; HOSTE, B.E.; DREYFUS, B.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; MASSON-BOIVIN, C. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and from a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3084-3094, 1999.

MORGANTE, P.G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**, 2003. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm>> acesso em novembro de 2008.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p.948-950, 2001.

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

OCHMAN, H.; MORAN, N., Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. **Science**, v.292, p1096-1081, 2001.

ORLA-JENSEN, S., Die hauptlinien des natürlichen bakterien systems. **Centralblatt für Bakteriologie**, Abt. II v.22, p.305-346, 1909.

PACE, N.R. New perspective on the natural microbial world: **Molecular Microbial Ecology**, v.62, p.463-470, 1996.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64(1); p.180–201, 2000.

PESOLE, G.; BOZZETTI, M. P.; LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONI, C. Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.88, p.522-526, 1991.

PESOLE, G.; GISSI, C.; LANAVE, C.; SACCONI, C. Glutamine synthetase gene evolution in bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.189-197, 1995.

POLHILL, R.M.; HAVEN, P.H. **Advances in legume systematics**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1981.

PUEPPKE, S.G. & BROUGHTON, W.J. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12(4), p.293–318, 1999.

RAPPE, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.369-394, 2003.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, 2008 (“in press”)

ROMERO, D.; BROM, S. The symbiotic plasmids of the Rhizobiaceae. In: FUNELL, B.E.; PHILIPS, G. (Eds.). **Plasmid Biology**. Washington, D.C: ASM Press, 2004. p.271-290.

SADOWSKY, M.J.; GRAHAM, P.H. Soil biology of the *Rhizobiaceae* In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A; HOOYKSAS, P.J.J. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.155-172.

SADOWSKY, M.J.; GRAHAM, P.H. **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. New York: Springer Verlag, 2002.

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

SALDAÑA, G.; MARTINEZ-ALCÁNTARA, V.; BALATTI, P.; VINARDELL, J.; BELLOGÍN, R.; RUÍZ-SAINZ, J. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). **Archives of Microbiology**, v.180(1), p.45–52, 2003.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L.D.; YOUNG, J.M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.49, p.155-179, 2003.

SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.426-433, 1991.

SESSITSCH, A; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* Research. **Critical Reviews in Plant Science**, v.21, p.323-378, 2002.

SHATTERS, R.G.; LIU, Y.; KAHN, M.L. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.469-475, 1993.

SNEATH, P.H. & SOKAL R.R. Numerical taxonomy. **Nature**, v.193, p.855-860 1962.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; NÁJERA, R.; Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.464-468, 1988.

SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J.; **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998.

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.

SHATTERS, R.G. & KAHN, J.L. Glutamine synthetase II in *Rhizobium*: reexamination of the proposed horizontal transfer of DNA from eukaryotes to prokaryotes. **The Journal of Molecular Evolution**, v.29, p.422-428, 1989.

STARR, M.P.; SCHMIDT, J.M. **Prokaryote diversity**, A. Handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. In: STARR, M. P; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEAEL, H.G. (Eds.) *The prokaryotes*. Berlin, Germany Springer-Verlag, 1981. p.3-42 .

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.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, 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.

SUI, X.; HAN, L.; WANG E.T.; JIANG, F.; LIU, Y.; CHEN, W. Novel associations between rhizobial populations and legume species within the genera *Lathyrus* and *Oxytropis* grown in the temperate region of China. **Science in China Press**, v.52, p.182-192, 2009.

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.

SY, A.; GIRAUD, E.; JORAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; MEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.214-220, 2001.

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.; PLEWNISK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

THOMPSON, F.L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C.B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5107-5115, 2005.

THOMPSON, F.L.; OLIVEIRA, V.M. Coleção de recursos microbianos & coleção brasileira de microrganismos do ambiente e indústria (CBMAI). Documento Taxonomia de procaríotos, 2005. Disponível em: [http://www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc./](http://www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc/) acesso em novembro de 2007.

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.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YASHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.468-476, 1995.

VAN BERKUM, P. & EARDLY, B.D. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae* In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Eds.) **The Rhizobiaceae: molecular biology of Plant-Associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.1-24.

VAN BERKUM, P. & FUHRMANN, J.J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p.2165-2172, 2000.

VAN BERKUM, P.; TEREFWORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTRÖM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.2988-2998, 2003.

VANDAMME, T.; POT, B.; GILLIS, M.; DEVOS, DE P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJIN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2096–2104, 1998.

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.

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

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

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

WANG, F.Q.; WANG, E.T.; LIU, J., CHEN, Q.; SUI, X.H.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.57, p.1192-1199, 2007.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

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.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p.305-313, 1993.

WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; MUNOZ-ADELANTADO, E.; GORIS, J.; De VOS, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53(4), p.1207–1217, 2003.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in Bradyrhizobium, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.623–632, 2001.

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

YOUNG, J.P.W.; JOHNSTON, A.W.B. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. **Trends in Ecology & Evolution**, v.4, p.341-349, 1989.

YOUNG, J.P.W. Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In: MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 587-592.

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

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with annended 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.

WEIR, B. S. (2006). **Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia**. Auckland, New Zealand, 241p. (PhD thesis. School of Biological Sciences, The University of Auckland).