



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCEL TAKAHIRO MORIWAKI

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS  
ISOLADOS DE PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS**

---

Londrina  
2017

MARCEL TAKAHIRO MORIWAKI

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS  
ISOLADOS DE PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moriwaki, Marcel Takahiro.

CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS. / Marcel Takahiro Moriwaki. - Londrina, 2017.  
107 f.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) - Tese. 2. Plantas não-leguminosas - Tese. 3. Microrganismos do gênero Rhizobium - Tese. 4. Filogenia - Tese. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

MARCEL TAKAHIRO MORIWAKI

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIZÓBIOS  
ISOLADOS DE PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Elisete Pains Rodrigues  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Daniele Sartori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 12 de junho de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço aos avós, que sempre lutaram para o bem da minha família, pessoas de grande importância na minha vida e de quem sinto muitas saudades.
- Aos meus queridos pais Hiro e Alice, pois sem eles nada seria possível. Por todo amor, educação e ensinamentos proporcionados durante todos esses anos. Por todas as horas de trabalho incansáveis, dedicadas exclusivamente a me oferecer as melhores condições durante toda minha vida pessoal e acadêmica. Devo tudo a eles! Essa conquista também é de vocês!
- Ao meu irmão Raphael, meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e aconselhando em todos os momentos.
- Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, uma das principais pessoas responsáveis pela conclusão deste trabalho, por sua paciência e tolerância diante de minhas atitudes. Por todo seu conhecimento, experiência e ideias compartilhadas, dedicando uma parte de seu tempo a mim. Saiba que sempre terá meu reconhecimento e admiração por ser um profissional extremamente competente e uma ótima pessoa. Minha eterna gratidão por me orientar durante esses anos.
- A Dra. Mariangela Hungria por conceder o laboratório para realizar os experimentos, ao Dr. Renan Augusto Ribeiro, Dra. Jakeline Delamuta, Doutoranda Luisa Helene, Dra. Rebeca Dallagnol por cederem seus tempos para me ajudar, por todo aprendizado e sabedoria transmitida. E a todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja que colaboram para a realização desse trabalho.
- A Dra. Diva de Souza Andrade por seu conhecimento e disponibilizar seu tempo para constituir a banca examinadora, aos colegas Amanda, Camila, Karina, Maria e Monica, ao Nelson, todos os professores, funcionários da pós –graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e pessoas que contribuíram de alguma com o trabalho. Muito Obrigado!

MORIWAKI, Marcel Takahiro. **Caracterização filogenética de rizóbios isolados de plantas não-leguminosas**. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Os rizóbios são microrganismos de grande importância para a manutenção da vida no planeta, principalmente por realizarem a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas leguminosas por meio de uma relação simbiótica entre a planta hospedeira e o microrganismo. Além disso, atuam como bactérias associativas na promoção do crescimento de plantas não-leguminosas por outros mecanismos. A possibilidade dos rizóbios serem aplicados como inoculantes em diversas culturas torna a caracterização taxonômica e filogenética de grande relevância em estudos de identificação de espécies de interesse agrícola. O gene 16S RNAr é considerado o principal marcador utilizado em estudos de filogenia, porém, outras análises também são recomendadas para um resultado mais preciso, como a metodologia MLSA (Multilocus Sequence Analysis). Este estudo teve como objetivo analisar as relações filogenéticas de 25 estirpes do gênero *Rhizobium*, isoladas a partir de plantas não-leguminosas como tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*) cultivadas em diferentes tipos de solos e também, obtidas diretamente de solos com manejos distintos. Para o trabalho foram escolhidos os genes *housekeeping glnIII*, *recA* e *rpoA*, além do gene 16S RNAr. Os resultados foram analisados a partir de uma árvore filogenética gerada com as sequências das estirpes dos genes individuais e concatenados. Todas as árvores apresentaram uma divisão de 3 grupos, onde se pôde observar uma alta diversidade intraespecífica e uma relação no posicionamento entre os microrganismos estudados e as plantas hospedeiras com seus respectivos solos. Os grupos 1 e 3 se destacaram por compreender o maior número de estirpes com potencial de representar uma nova espécie do gênero *Rhizobium*. Esta hipótese foi elaborada com base no posicionamento característico de novas espécies assumido pelos microrganismos estudados nas árvores geradas e nos valores de identidade nucleotídica comparados com os valores de referência relatados por outros autores, porém análises complementares são necessárias para chegar à confirmação de um microrganismo inédito. Com os resultados se estabeleceram por meio da eficiente metodologia MLSA, as relações filogenéticas entre as estirpes do estudo que apresentaram alta similaridade e homologia, com grande chance de representarem novas espécies, contribuindo assim, para a elaboração de futuros trabalhos de descrição de espécies de *Rhizobium*.

**Palavras-chave:** MLSA; plantas não-leguminosas e *Rhizobium*.

MORIWAKI, Marcel Takahiro. **Phylogenetic characterization of rhizobia isolated from non-leguminous plants**. 2017. 108 p. Dissertation (Master' s degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Rhizobia are microorganisms of great importance for the maintenance of life on the planet, mainly for the biological fixation of nitrogen (BNF) in leguminous plants through a symbiotic relationship between the host plant and the microorganism. In addition, they act as associative bacteria in promoting the growth of non-leguminous plants by other mechanisms. The possibility of rhizobia being applied as inoculants in several cultures makes the taxonomic and phylogenetic characterization of great relevance in studies of identification of species of agricultural interest. The 16S RNAr gene is considered the main marker used in phylogeny studies, but other analyzes are also recommended for a more accurate result, such as MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) methodology. The objective of this study was to analyze the phylogenetic relationships of 25 strains of the genus *Rhizobium*, isolated from non-leguminous plants such as tomato (*Solanum lycopersicum*) and lulo (*Solanum quitoense*) cultivated in different types of soils and also obtained directly from soils different managements. For the work, housekeeping genes *glnII*, *recA* and *rpoA*, besides the 16S RNAr gene, were chosen. The results were analyzed from a phylogenetic tree generated with the sequences of the strains of the individual and concatenated genes. All the trees presented a division of 3 groups, where a high intraspecific diversity and a relationship in the positioning between the studied microorganisms and the host plants with their respective soils could be observed. Groups 1 and 3 were distinguished because they comprise the largest number of strains with potential to represent a new species of the genus *Rhizobium*. This hypothesis was elaborated based on the characteristic position of new species assumed by the microorganisms studied in the generated trees and in the values of nucleoid identity compared with the reference values reported by other authors, but complementary analyzes are necessary to arrive at the confirmation of an unpublished microorganism. With the results, the phylogenetic relationships between the strains of the study that showed high similarity and homology were established through the efficient MLSA methodology, with a high probability of representing new species, thus contributing to the elaboration of future studies of *Rhizobium* species.

**Keywords:** MLSA; non-leguminous plants and *Rhizobium*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Perfil Box-PCR .....	50
<b>Figura 2</b> – Árvore filogenética das estirpes em estudo baseada no gene 16S RNAr .....	54
<b>Figura 3</b> – Árvore filogenética das estirpes em estudo baseada no gene <i>housekeeping glnII</i> . .....	61
<b>Figura 4</b> – Árvore filogenética das estirpes em estudo baseada no gene <i>housekeeping recA</i> . .....	62
<b>Figura 5</b> – Árvore filogenética das estirpes em estudo baseada no gene <i>housekeeping rpoA</i> . .....	63
<b>Figura 6</b> – Árvore filogenética das estirpes em estudo baseada na análise por MLSA .....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Espécies de plantas/meio onde os rizóbios foram isolados e tipos de solos utilizados nos cultivos.....	46
<b>Tabela 2</b> – Sequências de cada primer utilizado para amplificação dos genes e seus respectivos ciclos de amplificação .....	48
<b>Tabela 3</b> – Estirpes tipo utilizadas no trabalho e seus números de acesso .....	73
<b>Tabela 4</b> – Matriz de identidade nucleotídica (%) das estirpes do estudo e referência... ..	74
<b>Tabela 5</b> – Informações sobre as sequências das estirpes utilizadas no estudo. ....	75
<b>Tabela 6</b> – Números de acesso das estirpes estudadas no trabalho.....	76

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1	IMPORTÂNCIA E CONTRIBUIÇÃO DA FBN NA AGRICULTURA.....	15
3.2	RIZÓBIOS E LEGUMINOSAS. ....	18
3.3	ESPECIFICIDADE NA SIMBIOSE RIZÓBIO LEGUMINOSAS.....	20
3.4	BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS .....	23
3.5	INTERAÇÃO RIZÓBIO EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS .....	26
3.6	TAXONOMIA DE RIZÓBIOS .....	29
3.7	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS, GENOTÍPICAS E FILOGENÉTICAS DO GENÊRO <i>RHIZOBIUM</i> .....	35
3.7.1	Características Fenotípicas .....	35
3.7.2	Características Genotípicas.....	38
3.7.3	Características Filogenéticas.....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS. ....	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA. ....	46
4.2.1	Extração do DNA Total .....	46
4.2.2	Amplificação do DNA por PCR .....	47
4.2.3	Reações de Sequenciamento e Análise Filogenética.....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
5.1	BOX-PCR. ....	49
5.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE 16S RNAR.....	50
5.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES HOUSEKEEPING <i>GLNII</i> , <i>RECA</i> E <i>RPOA</i> .....	55
5.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MLSA.....	64
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>69</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>ANEXOS</b> .....	103
ANEXO A – Árvore filogenética com todas as estirpes tipos baseada no gene 16S RNAr.....	104
ANEXO B – Árvore filogenética com todas as estirpes tipos baseada no gene <i>housekeeping glnII</i> .....	105
ANEXO C – Árvore filogenética com todas as estirpes tipos baseada no gene <i>housekeeping recA</i> .....	106
ANEXO D – Árvore filogenética com todas as estirpes tipos baseada no gene <i>housekeeping rpoA</i> .....	107
ANEXO E – Registro de submissão do artigo .....	108

## 1 INTRODUÇÃO

Pesquisas que visam à descrição da biodiversidade presente na natureza apresentam grande potencial biotecnológico. Porém, a grande maioria dos organismos vivos são ainda desconhecidos pelo ser humano, principalmente vírus, fungos e bactérias. Estima-se que apenas 10% dos organismos procariotos foram descritos e estocados em coleções de culturas no mundo todo. A pesquisa da diversidade microbiana, mediante estudos taxonômicos, representa um amplo campo de pesquisas que possibilita o entendimento das relações e processos que os organismos medeiam em um determinado ecossistema (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A descrição de espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* é de grande interesse devido ao importante papel exercido por essas bactérias, a fixação biológica do nitrogênio (FBN), que ocorre principalmente em plantas do tipo leguminosas. Porém, outra habilidade tem chamado à atenção, a capacidade destes microrganismos atuarem na promoção do crescimento vegetal em associação com plantas não-leguminosas através de outros mecanismos, como a produção de fito hormônios, sideróforos, antibióticos, assimilação de nutrientes e proteção do hospedeiro contra fito patógenos (JAMES & BALDANI, 2012).

O gênero *Rhizobium* pertence à família Rhizobiaceae, que é constituída atualmente por oito gêneros: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Carpophilus*, *Chelatobacter*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Allorhizobium*, *Kaistia* e *Shinella* (KUYKENDALL 2005; PARTE, 2014). Inicialmente, o gênero *Rhizobium* era conhecido por agrupar bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio (N) em relações simbióticas com plantas da família Leguminosae (BODDEY et al., 2003; BALDANI E BALDANI, 2005; FRANCHE et al., 2009). Nos últimos anos, porém, foram isolados bactérias do gênero *Rhizobium* em associação com plantas não-leguminosas, encontradas colonizando tanto a região rizosférica, quanto interior (endofíticas) ou superfície (epifíticas) dos tecidos vegetais.

A taxonomia de procariontes tem como objetivo, classificar, nomear e identificar os microrganismos. A classificação é definida como o arranjo dos organismos em grupos taxonômicos e se baseia na similaridade de

características fenotípicas e genotípicas. A nomenclatura refere-se ao nome das unidades ou táxon definidas na classificação, seguindo o Código Internacional para Nomenclatura de Bactérias (LAPAGE et al., 1992). A identificação é o processo de determinação segundo características, se um organismo pertence a uma das unidades definidas pela classificação e nomenclatura (VANDAMME et al., 1996). Atualmente, a taxonomia polifásica tem sido a estratégia empregada para a descrição bacteriana, que consiste na integração de dados e informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (MOORE et al., 2010).

Os estudos filogenéticos se fundamentam na similaridade das sequências gênicas para estabelecer as relações evolutivas dos organismos. Os dados obtidos são analisados por softwares de bioinformática e os resultados reproduzidos na forma de dendograma ou árvores filogenéticas. O sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado a principal análise para estabelecer as relações filogenéticas de microrganismos, porém, não é suficiente para a distinção de estirpes proximamente relacionadas. Para suprir essa necessidade, a técnica Multilocus Sequence Analysis (MLSA) tem sido indicada. No MLSA, as sequências de genes *housekeeping*, que são essências para metabolismo dos microrganismos, são comparadas individualmente e concatenadas para a montagem das árvores filogenéticas.

Pelo fato dos microrganismos do gênero *Rhizobium* apresentarem maior preferência por plantas leguminosas e serem encontrados em maior número nesse tipo de planta hospedeira, a identificação e aplicação destes microrganismos em plantas não-leguminosas tornou-se um grande desafio encarado pelo grupo de pesquisa liderado pelo professor Dr. André Luiz Martinez de Oliveira. Seguindo esta linha de pesquisa, o estudo foi elaborado visando esclarecer as relações filogenéticas de estirpes de *Rhizobium* isoladas de plantas não-leguminosas, dando continuidade ao trabalho de Zuluaga e colaboradores (2015), onde estes microrganismos foram isolados a partir de amostras de solo, raízes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*) cultivados em solos de diferentes tipos de manejo obtidos na fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina.

Os resultados poderão ser utilizados em trabalhos posteriores com o objetivo de identificação de novas espécies de microrganismos e a

elaboração de produtos comerciais com aplicação na agricultura, visando a menor utilização de fertilizantes químicos e contribuindo desta forma, para o desenvolvimento biotecnológico e agrônômico de maneira sustentável.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as relações filogenéticas de bactérias do gênero *Rhizobium*, isoladas de plantas não-leguminosas, como tomate (*Solanum lycopersicum*), lulo (*Solanum quitoense*) e do solo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sequenciar o gene 16S RNAr e os genes *housekeeping glnII*, *recA* e *rpoA* para o posicionamento taxonômico das bactérias do gênero *Rhizobium*, por meio da técnica MLSA.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 IMPORTÂNCIA E CONTRIBUIÇÃO DA FBN NA AGRICULTURA.

O nitrogênio (N) é um elemento essencial à vida, presente em muitas biomoléculas como ácidos nucleicos, enzimas, proteínas, DNA e RNA (FERGUSON, 1998; SMIL, 2004). Na natureza, o N existe principalmente sob a forma gasosa e constitui aproximadamente 78% da atmosfera. Sendo considerado, um dos elementos mais limitantes para o desenvolvimento dos ecossistemas (DALTON & KRAMER, 2006).

A maioria dos organismos obtém o N sob as formas de amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (CHENG, 2008; CANFIELD, 2010; THAMDRUP, 2012). Desse modo, para que o N seja utilizado por organismos como plantas e conseqüentemente pelos animais, primeiro o N precisa ser incorporado no solo, onde este processo ocorre através das seguintes maneiras: pela aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados produzidos industrialmente pelo processo Haber-Bosch (HABER, 1923; SMIL, 2004), através de processos geoquímicos como relâmpagos (GRUBER, 2008) e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), tornando-o assim assimilável pelas plantas, onde este N permanece no solo pela decomposição da matéria orgânica.

A FBN ocorre através da ação da enzima nitrogenase (BURK, LINEWEAVER, HORNER; 1934), encontrada em um grupo de microrganismos denominados diazotróficos (MCGLYNN, BOYD, PETERS, ORPHAN; 2013). Entre os microrganismos diazotróficos, se destacam os rizóbios, bactérias que fixam o N em diversos tipos de plantas em diferentes graus de especificidade. Os rizóbios podem ser encontrados em vida livre, associados ou na maioria das vezes estabelecendo relações simbióticas com plantas leguminosas. O N encontrado no ambiente sob a forma de  $\text{N}_2$ , é relativamente inerte, devido à estabilidade da tripla ligação entre os dois átomos que o tornam inacessível para os eucariotos (MACKAY, 2004; JIA, 2014). Desse modo, a FBN catalisada pela enzima nitrogenase, torna o N assimilável para as plantas e assim para os eucariotos através da alimentação.

A nitrogenase é constituída por um complexo enzimático de duas proteínas: o componente redutase, onde o Ferro (Fe) está presente e o

componente catalítico, composto pelo complexo Ferro Molibdenio (MoFe). A atividade enzimática para a redução do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) é um processo dependente de altos níveis de ATP (BURGESS, 1996; SEEFELDT, 2009), porém em condições aeróbicas a enzima é irreversivelmente inativada, necessitando de mecanismos de proteção por parte de microrganismos aeróbios a fim de evitar a perda da atividade catalítica.

A FBN tem um profundo impacto econômico e ecológico, devido o N representar o nutriente que mais limita a produção agrícola em todo o mundo (SMIL, 2004). Para contornar essa limitação foi desenvolvido há cerca de 100 anos atrás, um processo industrial para a produção de fertilizantes químicos nitrogenados, conhecido como Haber-Bosch (STOLTZENBERG, 2014). Este processo foi essencial para a produção agrícola mundial e para o desenvolvimento da sociedade, pois quase metade da população humana poderia não existir sem a sua aplicação.

Apesar da grande importância do processo Haber-Bosch, muitos problemas estão associados com a sua prática. Por ser um processo industrial e exigir elevadas condições de temperatura ( $350-550\text{ }^\circ\text{C}$ ) e pressão ( $250-350\text{ atm}$ ) (BRUINJIN, 2015), o procedimento necessita de alta demanda energética, cerca de 3% a 5% de gás natural anualmente (MYROLD & BOTTOMLEY, 2007). Além disso, há uma grande liberação de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) durante as etapas de produção, em torno de 275 milhões de toneladas por ano (RAZON, 2014). Outra adversidade é a baixa eficiência de fertilizantes nitrogenados, em que apenas 60% é incorporado pelas culturas e 40% perdido pela lixiviação (GALLOWAY, 2004; ERISMAN et al., 2008). O N não aproveitado das plantações pode levar a eutrofização de rios e lagos, induzindo a liberação de óxido nitroso ( $N_2O$ ), um gás extremamente tóxico com potencial 300 vezes superior ao  $CO_2$  em intensificar o aquecimento global (GRESSHOFF, 2014). Dessa maneira, a FBN se mostra uma ótima opção para um menor consumo energético e conseqüentemente, diminuição da poluição gerada pelo processo Haber-Bosch.

Globalmente, estima-se que 200 milhões de toneladas de N são necessários anualmente para as culturas agrícolas, das quais cerca de 170 milhões de toneladas provém pelo processo industrial Haber-Bosch

(CANFIELD et al. 2010). Estudos apontam que aproximadamente 140 milhões de toneladas de N atmosférico são biologicamente fixados por ano (HERRIDGE et al., 2008), porém a maior parte, aproximadamente 100 milhões de toneladas, resulta da fixação biológica em ecossistemas naturais terrestres (GALLOWAY, DENTENER, CAPONE; 2004). Então a FBN em culturas agrícolas, representa ainda uma pequena porção do total deste processo. Pesquisas indicam para o ano de 2018, um aumento de cerca de 18% no consumo de fertilizantes nitrogenados para América Latina (FAO, 2015).

Se uma redução de 10 % do uso de fertilizantes químicos nitrogenados ocorrerem até 2020 na União Européia, uma economia de quase US\$ 20 bilhões será obtida. O valor poderá ser ainda maior, levando em consideração os custos totais economizados com a preservação do meio ambiente (GOOD, BEATTY, 2011; NG et al, 2013). No Brasil, a FBN contribui com uma economia de aproximadamente US\$ 7 bilhões anuais em culturas de soja (EMBRAPA, 2015). No caso da cana-de-açúcar, a economia gerada corresponde a cerca de R\$ 200 milhões por ano, se for considerado que processo de FBN contribui com cerca de 65% do N fixado nesta cultura (REIS et al, 2006).

Em áreas do mundo onde há pouco ou nenhum acesso a fertilizantes nitrogenados, a FBN é uma ótima alternativa para aumentar a produtividade e assim, diminuir a fome e a pobreza. Em áreas com acesso a fertilizantes, a FBN reduziria os danos ambientais provocados pela dependência de adubos químicos. Ao considerarmos os desafios que produção de alimentos enfrentará, necessitaremos de métodos que permitam o aumento da produção agrícola, mas que sejam economicamente viáveis e sustentáveis simultaneamente. A dependência de insumos químicos na agricultura pode não ser suportável à longo prazo, tornando a FBN uma prática a ser cada vez mais empregada, afim de contornar este problema.

A FBN tem se mostrado indispensável para a sustentabilidade da agricultura brasileira, haja vista o fornecimento de nitrogênio às culturas resultando em maior economia e menor impacto ambiental (HUNGRIA et al., 2007). Sendo assim, a FBN é uma das principais alternativas para aumentar a produtividade agrícola, para suprir a demanda de alimentos futuramente, e

reduzir os problemas ambientais e econômicos ligada à utilização de fertilizantes químicos nitrogenados.

### 3.2 RIZÓBIOS E LEGUMINOSAS

Leguminosae ou Fabaceae, família das plantas leguminosas, compreendem cerca de 750 gêneros e 19.000 espécies, sendo divididas em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae). As leguminosas são plantas que apresentam flores e produzem vagens, podendo ocorrer sob diversas formas como ervas dicotiledôneas, arbustos, cipós, trepadeiras lenhosas ou árvores em habitats terrestres e ocasionalmente em meios aquáticos (LEWIS et al., 2005).

As plantas leguminosas incluem espécies de grãos e pastagens importantes para consumo humano e animal, podendo ser utilizadas também para a produção de papel, como combustível, elaboração de produtos químicos e medicamentos, e para fins ornamentais (LEWIS et al., 2005). Algumas leguminosas de importância nutricional humana e animal incluem as espécies *Arachis hypogaea* (amendoim), *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Pisum sativum* (ervilha). Outras plantas leguminosas têm um grande valor agrícola e ecológico, como as espécies *Vicia spp.* (ervilhaca) utilizada na adubação verde e *Trifolium repens* (trevo branco) cultivada em associação com gramíneas para favorecer a entrada N em pastagens (ANDREWS et al, 2007, 2011 e RIVAS et al, 2009; SPRENT, 2009).

Os rizóbios apresentam grande afinidade por plantas do tipo leguminosas. Estes microrganismos colonizam a rizosfera de plantas leguminosas, infectam as suas raízes e fixam biologicamente o N (nitrogênio). A FBN é estabelecida através de uma relação simbiótica entre os rizóbios e planta hospedeira (SOHRABI et al.; 2012 e ESKIN; 2012). A simbiose é um tipo de mutualismo, relação em que ambos os organismos se beneficiam. Ela é considerada uma das mais importantes interações entre plantas e microrganismos na natureza, pois desempenham um papel essencial no ciclo do nitrogênio (DIOGNON-BOURCIER et al., 2000 e LUPWAYI, KENNEDY, CHIRWA; 2011).

A fixação do N por rizóbios resulta na formação de nódulos característicos nas raízes de leguminosas. Estes nódulos tem a função de proteger intracelularmente os rizóbios, e enquanto recebem o carbono da planta hospedeira, os microrganismos fornecem em troca o N que a planta necessita, estabelecendo assim, uma relação simbiótica entre os organismos (POOLE et al, 1994; HALVERSON e STACEY, 1986). O processo de nodulação e fixação de N depende da capacidade de sobrevivência, competitividade e eficiência das espécies de rizóbios. No solo, vários fatores interferem na eficiência do processo, como temperatura, luz e a interação com outros microrganismos presentes na rizosfera (PREVOST et al, 2003; HUNGRIA e KASCHUK, 2014). O sucesso da simbiose depende também de um esforço muito coordenado entre hospedeiro e a bactéria, em razão de uma troca de sinais moleculares específicos entre os dois organismos (PARNISKE e DOWNIE; 2003).

A cultura de leguminosas necessitam de 35% a 60% menos fertilizantes nitrogenados em comparação com plantas não-leguminosas, reduzindo substancialmente o requisito de N a partir de fontes externas, graças à FBN (JENSEN et al., 2012; BHATTACHARYYA e JHA, 2012). Estudos demonstraram que a contribuição da simbiose varia de 13 a 360 kg N ha<sup>-1</sup>, sendo muito maior que sistemas não-simbióticos (10 a 160 kg N ha<sup>-1</sup>), tornando ainda mais evidente a eficiência da FBN em leguminosas (BOHLOOL et al., 1992). Foi relatado que a quantidade de N fixado em culturas de leguminosas, como amendoim variou de 126 a 319 kg N ha<sup>-1</sup>, soja de 33 a 643 kg N ha<sup>-1</sup> e feijão-caupi de 25 a 100 kg N ha<sup>-1</sup> (PEOPLES e CRASWELL, 1992).

A FBN contribui também com o crescimento de plantas não-leguminosas por ser muito empregado na rotação de culturas para enriquecer o solo com N. Desta maneira, a FBN é uma ótima opção para suprir as necessidades de N de uma maneira eficiente e barata, tanto em culturas leguminosas quanto não-leguminosas (ROYCHOWDHURY, BANERJEE, SOFKOVA e TAH; 2013).

Além de favorecer o desenvolvimento das culturas agrícolas e beneficiar agricultores (HARU e ETHIOPIA, 2012), a simbiose promove o aumento do teor de proteínas em leguminosas, que é vital para a dieta principalmente de comunidades pobres que as utilizam como alimento

principal. Consequentemente, a exploração da FBN contribui para melhor nutrição do solo e saúde humana (POPELKA et al., 2004).

### 3.3 ESPECIFICIDADE NA SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA.

A especificidade na simbiose se refere à capacidade que as espécies de rizóbios possuem em estabelecer uma relação simbiótica com uma espécie de planta leguminosa exclusiva, ou seja, em alguns casos a planta hospedeira tem o seu próprio parceiro simbiótico (GYÖRGYPAL, IYER e KONDOROSI; 1988). O estudo da especificidade permite entender de que maneira é estabelecida a simbiose e, a partir disso, desenvolver formas para que este processo ocorra em plantas e microrganismos incapazes de estabelecer esta relação. A capacidade de fixar biologicamente o N evoluiu em diversas linhagens de rizóbios, porém, não são todas as plantas do tipo leguminosa capazes de estabelecer uma relação simbiótica, atualmente são conhecidas aproximadamente 12 mil espécies de leguminosas com esta capacidade.

A simbiose é desencadeada por privação de nitrogênio (N) na planta hospedeira, que seleciona o seu parceiro rizóbio entre bilhões de bactérias na rizosfera. A maioria das leguminosas são conhecidas por serem promíscuas, isso significa que elas podem ser noduladas por diferentes espécies de rizóbios. Entretanto, algumas espécies são extremamente restritivas, aceitando apenas uma pequena parcela de simbiontes.

A taxonomia de rizóbios não reflete globalmente as características simbióticas como a sua gama de plantas hospedeira. Por exemplo, embora a espécie *Sinorhizobium* sp.NGR234 nodule 232 espécies de leguminosas, de 112 gêneros distantes, algumas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* não nodulam plantas específicas como a ervilha (*Pisum sativum*) (OVTSYNA et al, 1998; MASSON-BOIVIN et al, 2009).

A utilização de algumas estirpes de rizóbios na forma de inoculantes falharam em vários ambientes, devido a razões como a alta especificidade da planta hospedeira com determinado microrganismo (STREETER, 1994). A combinação perfeita entre leguminosas e o seu parceiro rizóbio, resulta na formação de nódulos efetivos que apresentam como

característica uma coloração interior avermelhada, demonstrando o sucesso da fixação de N (SIRONVAL, BONNIER e VERLINDEN; 1957). Se a inoculação ocorrer de maneira imperfeita, nódulos ineficazes podem ser formados, conseqüentemente, a FBN não ocorrerá (GWATA, WOFFORD, BOOTE, e MUSHORIWA, 2004).

A especificidade é estabelecida tanto nas fases iniciais, de interação associada à infecção bacteriana e formação de nódulos, quanto nas fases tardias relacionadas à fixação de N. A combinação de uma ampla gama de compostos secretados por ambas, planta e bactéria, é o componente chave para estabelecer simbiose, onde o reconhecimento do exsudato característico da raiz (flavonoides), por parte do rizóbio, e a estrutura do fator de nodulação (FN), por parte da planta, determinam o hospedeiro e o seu microrganismo simbiote (HARU e ETHIOPIA, 2012).

Uma vez que o primeiro passo é a exsudação de flavonoides pela planta, esta etapa pode ser considerada a mais importante. Estes exsudados são continuamente secretados na rizosfera, mas o número e concentração destes compostos aumentam quando as bactérias compatíveis são detectadas pela planta hospedeira (ZAAT et al, 1989; DAKORA et al, 1993, HASSAN e MATHESIUS, 2012).

Os flavonoides variam de acordo com as espécies vegetais e só são reconhecidos por determinadas espécies de rizóbios, conferindo assim, o primeiro nível de especificidade simbiótica (HASSAN e MATHESIUS, 2012). Alguns flavonoides secretados por plantas leguminosas são a genisteína e daidzeína, isoflavonas produzidos pela soja e a flavona 7,4 dihidroxiflavona (DHF), sinal originado pelo trevo branco. Após a identificação dos flavonoides pelos rizóbios, uma atração quimiotática inicial é estabelecida, seguida pela síntese do “sinal de retorno” chamado de Fator de Nod (DÉNARIÉ et al., 1996).

O reconhecimento bacteriano dos flavonoides proporciona a oportunidade de escolha das plantas, promovendo a expressão de genes simbióticos de uma cepa específica de rizóbio (SPAINK, 2000). Estes sinais ativam três grupos principais de genes de nodulação nas bactérias, os genes *nodABC* presentes em quase todos os rizóbios (GIRAUD et al., 2007), envolvidos na síntese da estrutura básica dos Fatores Nod. Os genes *nodA* e *nodC* determinam a gama de hospedeiros do rizóbio, vários produtos

sintetizados pelo gene *nodA* reconhecem e transferem ácidos graxos específicos para os oligômeros de quitina presentes nos fatores de nodulação e o gene *nodC*, determina o comprimento dessa cadeia.

Fatores Nod bacterianos são compostos de quatro a cinco unidades de N-acetilglucosamina, com ligações beta 1-4 (a cadeia principal de quitina) e um ácido graxo (D'HAENZE e HOLSTERS, 2002). Os Fatores Nod diferem nos seus ácidos graxos, no comprimento da cadeia, na saturação da unidade Acil e modificações como glicosilação, sulfatação e metilação nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia principal (RICE-EVANS, 2001; SIMMS e TAYLOR, 2002; BROUGHTON, ZHANG, PERRET e STAEHELIN, 2003). Estas substituições são específicas para cada hospedeiro e estão envolvidas com o segundo nível de especificidade na simbiose (LONG, 1996). Além dos Fatores Nod, muitos polissacarídeos da superfície bacteriana também estão envolvidos na especificidade simbiótica, incluindo exopolissacarídeo (EPS), lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos extracelulares (SSPE) e polissacarídeos capsulares (DEAKIN e BROUGHTON, 2009).

O reconhecimento dos fatores é mediado por receptores específicos para o Fator Nod (NFRs), constituídos de quinases de serina/treonina, localizados na membrana das raízes (LIMPENS et al., 2003; MADSEN et al., 2003; RADUTOIU et al., 2003; ARRIGHI et al., 2006). Estes NFRs reconhecem a estrutura do Fator Nod causando a sua discriminação, resultando no segundo nível de especificidade simbiótica (SIMMS e Taylor, 2002).

Os NFRs transmitem um sinal desconhecido para o núcleo da raiz, causando a assimilação de íons de cálcio (OLDROYD et al., 2011). Isso provoca uma alteração na polaridade das células vegetais, resultando no crescimento da raiz em uma nova direção (GAGE, 2004). A câmara de infecção se amplia e se transforma em um espaço apoplástico globular, em seguida, o crescimento da raiz é alterado de radial para um alongamento polar na ponta da raiz (FOURNIER et al., 2015), provocando o crescimento do cordão de infecção. Tanto a epiderme e o córtex reconhecem os fatores de nodulação, a epiderme regula a infecção de rizóbios e o córtex da raiz é responsável pela formação dos nódulos (OLDROYD E DOWNIE, 2008). As células corticais

evoluem para um nódulo primordial e quando encontram o cordão de infecção, os rizóbios entram nas células e são encapsulados dentro de uma membrana peri-bacteróide (OLDROYD e DOWNIE, 2008). Isso permite que as bactérias sofram sucessivas divisões, para posterior formação de nódulos.

Alguns rizóbios secretam também proteínas que estão envolvidas na nodulação através do sistema de secreção tipo III (FAUVART e MICHIELS, 2008; DEAKIN e BROUGHTON, 2009). Estas proteínas, chamadas de proteínas exteriores de nodulação (Nops), podem contribuir para a supressão da resposta imune de leguminosas ou modular o rearranjo do citoesqueleto das células da raiz durante o desenvolvimento de nódulos (BARTSEV et al., 2004; SKORPIL et al., 2005; SOTO et al., 2009).

Como foi relatado, rizóbios de diferentes gêneros infectam as mesmas espécies de plantas, mas algumas espécies de plantas podem ser infectadas apenas por determinadas espécies de rizóbios (BOTHA, JAFTHA, BLOEM, HABIG e LAW, 2004). O estudo deste fenômeno é essencial para fornecer informações para aperfeiçoar a eficiência de inoculantes destinados a plantas leguminosas, evitando que novos produtos apresentem incompatibilidade ao serem testados.

### 3.4 BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS.

Espécies de *Rhizobium* são conhecidas por realizarem a fixação do N, podendo ser de vida livre, associativas ou comumente estabelecendo simbiose com plantas leguminosas. No caso de bactérias associativas podem ser encontradas na superfície radicular, no interior (bactérias endofíticas) e na rizosfera (bactérias rizosféricas) das plantas. Bactérias endofíticas foram definidas como microrganismos detectados dentro de plantas superficialmente esterilizadas ou extraídos do interior dos tecidos vegetais, não causando efeitos danosos ao hospedeiro (HALLMANN et al., 1997; MONTEIRO et al, 2012).

Bactérias associativas em culturas não-leguminosas atuam como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Recebem esta denominação, por promover o desenvolvimento das plantas através de outros mecanismos além da fixação do N, como a produção de fitohormônios,

sideróforos e solubilização de minerais (KUMAR e RAM, 2014). Curiosamente, algumas estirpes de *Rhizobium* estabelecem relações simbióticas com espécies de plantas não-leguminosas do gênero *Parasponia*, que resulta em nodulação com cepas isoladas apenas desta não-leguminosa (TRINICK, 1979). Quando a *Parasponia* spp. é inoculada com espécies do gênero *Rhizobium* isolados de leguminosas, se observa uma nodulação ineficaz.

Foi relatado que espécies de *Rhizobium* são capazes de colonizar as raízes de não-leguminosas com tanta eficiência quanto colonizam plantas leguminosas (CHABOT et al., 1993), demonstrando a adaptação destes microrganismos. Espécies do gênero *Rhizobium* foram encontradas em diferentes culturas, como algodão (MCINROY & KLOPPER, 1995), milho (GUTIERREZ-ZAMORA & MARTÍNEZ-ROMERO, 2001), trigo (SHARMA et al., 2005), cana-de-açúcar (BELLONE & BELLONE, 2006), cenoura (ANTOUN et al., 1998) e arroz (ZHANG et al., 2011).

A colonização de *Rhizobium* em não-leguminosas pode ter sido promovida pela capacidade de adaptação do microrganismos, aliada a antiga prática de rotação de culturas entre leguminosas e não leguminosas. Neste contexto, a espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* foi encontrado como um endófito natural do arroz provavelmente como resultado de uma tradição de 700 anos no Egito, de cultivar arroz em rotação com a cultura de trevo Berseem ou Trevo do Egito (YANNI et al., 1997). Esta espécie de rizóbio demonstrou promover o crescimento de culturas de arroz por meio da solubilização de fosfato e produção de AIA (YANNI et al., 2001).

Um estudo conduzido na China descreveu um grupo de novos isolados do gênero *Rhizobium* obtidos a partir de raízes de espécies silvestres de arroz (*Oryza alta*). Estes isolados do arroz, potencialmente fornecem nitrogênio para a planta e promovem o seu crescimento. Esta nova espécie foi nomeada como *Rhizobium oryzae* (PENG et al. 2008). Em outro estudo, foi verificado que rizóbios inoculados em arroz podem melhorar as taxas de germinação das sementes, estimular o crescimento radicular e da parte aérea, além de aumentar a produção de grãos (YANNI e DAZZO, 2010).

No México, foram isolados a partir de raízes de milho superficialmente esterilizadas, estirpes de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*, simbionte do feijão. Estas estirpes foram encontradas em locais onde o feijão e

milho eram cultivados em rotação (GUTIERREZ-ZAMORA E MARTINEZ-ROMERO, 2001). No México também, foi relatada a presença da espécie *Rhizobium daejeonense* em associação na rizosfera da planta *Agave americana*, a estirpe se mostrou capaz de sintetizar o ácido indol-3-acético (AIA), solubilizar o fosfato e apresentou atividade da enzima nitrogenase (TORRE-RUIZ et al., 2016).

A espécie *Rhizobium capsici*, encontrada em associação com o pimentão verde (*Capsicum annuum* var. *Grossum*), foi identificada e isolada a partir das raízes desta planta não-leguminosa em Taiwan (LIN et al. 2015). Novas espécies deste gênero também foram encontradas em associação e isoladas de diferentes plantas, como estirpes de *R. alamii* da rizosfera de girassóis (BERGE et al., 2009); *R. pseudoryzae* (ZHANG et al. 2011) e *R. oryzicola* (ZHANG et al., 2015) ambas isoladas do arroz; *R. straminoryzae* (LIN et al., 2014) isoladas da palha de arroz; *R. Populi* (ROZAHON et al., 2014) isolada endofiticamente da planta não-leguminosa *Populus euphratica* na China; *R. lemnae* (KITTIWONGWATTANA E THAWAI, 2014), encontrada endofiticamente na planta não-leguminosa *Lemna aequinoctialis*; *R. helianthi* (WEI et al., 2015) isolada a partir da rizosfera de girassóis; *R. tropici* (MCINROY e KLOEPPER, 1995) encontrada associada endofiticamente nos caules de árvores de algodão híbrido (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) e *R. undicola* associada endofiticamente em folhas e raízes de banana (*Musa* spp.) (MARTINEZ et al., 2003).

Muitos estudos de inoculação de espécies de *Rhizobium* em culturas de plantas não-leguminosas, demonstraram a capacidade destes microrganismos atuarem como BPCV. Chabot e colaboradores (1996), estudaram a aplicação de espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em culturas de milho e alface, onde observaram a capacidade destes microrganismos atuarem como BPCV através de mecanismos como a solubilização de fosfato e produção de sideróforos e fitohormônios como AIA.

Na inoculação em não-leguminosas como tomate e pimenta, constatou a capacidade da espécie *R. leguminosarum* bv *trifolii* e *viciae* em colonizar as raízes e favorecer crescimento dos frutos por mecanismos como a produção de sideróforos e AIA (GARCIA-FRAILE et al., 2012). O efeito da inoculação de *R. leguminosarum* em sementes de tomate e pimenta foi

positiva, uma vez que as mudas se desenvolveram mais em comparação com as plantas não inoculadas. No caso dos frutos, o efeito da inoculação também foi positivo em ambos, tomate e pimenta, embora na pimenta foi mais ligada à produção de frutos, com aumentos significativos na massa fresca e no caso do tomate, mais ligada à qualidade, uma vez que foram encontrados maiores percentagem de Nitrogênio, Fósforo, Potássio e Magnésio (GARCIA-FRAILE et al., 2012).

As espécies *R. alamii* (ALAMI et al., 2000) e *R. etli* (GUTIERREZ-ZAMORA & MARTINEZ-ROMERO, 2001), se comportaram como BPCV em culturas de girassol e milho, respectivamente, porém os mecanismos de promoção de crescimento não foram esclarecidos.

O isolamento e caracterização de bactérias associativas em plantas não-leguminosas, representa um amplo campo de pesquisas e de grande interesse mundial. Portanto, a descoberta e aplicação de novos microrganismos podem beneficiar culturas economicamente importantes, resultando em uma melhor produtividade e sustentabilidade.

### 3.5 INTERAÇÃO ENTRE RIZÓBIOS EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS

A inoculação de rizóbios em culturas leguminosas é provavelmente o emprego de bactérias mais difundido na agricultura devido à capacidade de fixação de N apresentado por estes microrganismos. No entanto, o suprimento de N em culturas não-leguminosas não apresenta a mesma eficiência quanto na simbiose estabelecida em leguminosas (BALDANI & BALDANI, 2005). Apesar disso, os rizóbios também possuem a capacidade de atuarem como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associado a culturas de não-leguminosas (MOREIRA et al., 2010, HUNGRIA, 2011; JAMES & BALDANI, 2012). Em um estudo, Chabot e colaboradores (1996) demonstraram a colonização de alface e milho pela espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. Höflich (2000) avaliou a colonização de espécies de *Rhizobium* strain R39 em raízes de milho, trigo e beterraba. Em outro trabalho realizado por Garcia-Fraile P. e colaboradores (2012), foram observados a colonização de raízes de tomate e pimenta por espécies de *Rhizobium leguminosaraum* bv. phaseoli e trifolli.

A colonização radicular é o primeiro passo na interação de bactérias associativas em plantas não-leguminosas (KLOEPPER e BEAUCHAMP, 1992), para tal, os microrganismos devem ser capazes de se adaptar e sobreviver na rizosfera destas plantas. As aberturas ou fissuras da epiderme das raízes secundárias são os locais pelo qual os rizóbios penetram (PERRINE-WALKER et al., 2007), podendo colonizar tanto a superfície radicular (rizoplano) como o interior dos tecidos vegetais (endofítico). Após a entrada, algumas bactérias associativas ascendem pelo xilema para as partes aéreas das plantas (YANNI e DAZZO, 2010). Algumas espécies de rizóbios foram encontradas endofiticamente em raízes, caules e folhas de plantas não-leguminosas, tais como: arroz, milho, trigo e canola entre outras (PERRINE-WALKER et al., 2007; YANNI e DAZZO, 2010; OSORIO FILHO et al., 2014; HAHN et al., 2014).

Os rizóbios podem atuar no desenvolvimento das plantas através da fixação de N, mas os principais mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de não-leguminosas são a produção e excreção de fitohormônios, sideróforos, antibióticos, solubilização de nutrientes e proteção do hospedeiro contra fitopatógenos (DUTTA, MISHRA E KUMAR, 2007; KUMAR E RAM, 2014). Estes mecanismos executados por BPCV em plantas não-leguminosas, ocorrem através de uma combinação de efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos são a síntese de hormônios vegetais e vitaminas, a inibição da síntese de etileno, melhoria na absorção de nutrientes, maior resistência ao estresse, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico. Os efeitos indiretos são capazes de diminuir ou prevenir os efeitos deletérios manifestados por microrganismos patogênicos, principalmente através da síntese de antibióticos e/ou compostos fungicidas por meio da competição por nutrientes como a produção de sideróforos ou pela indução da resistência sistêmica contra agentes patogênicos. Outro mecanismo indireto é a promoção do crescimento vegetal através da interação com outros microrganismos benéficos (BULGARELLI et al., 2013).

Os principais fitohormônios produzidos por rizóbios promotores do crescimento são auxinas, citocininas e giberelinas, (ZAHIR et al, 2004; KHALID et al, 2006). Estes fitohormônios são essenciais para o desenvolvimento da planta durante seu ciclo de vida (CHIWOCHA et al., 2003).

A capacidade de algumas espécies de *Rhizobium* associativas produzirem fitohormônios depende das características do microrganismo, da planta colonizada e do meio em que se encontram (HUMPHRY et al., 2007).

O ácido indol acético (AIA) é a auxina natural comumente encontrada nas plantas e exerce um efeito positivo sobre o crescimento de raízes laterais e pelos radiculares, aumentando a absorção de nutrientes (MIRANSARI e SMITH, 2014). Os outros fitohormônios como as giberelinas atuam no crescimento da raiz primária, enquanto que as citocinas complementam a ação das giberelinas por induzir a divisão celular, promovendo o crescimento da radícula (CROZIER et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004). O etileno é outro fitohormônio envolvido no desenvolvimento das plantas que em altas concentrações pode ser prejudicial a ela (LI et al., 2005). Para controlar os níveis de etileno, algumas espécies de rizóbios associativos sintetizam a enzima ACC deaminase (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) que inibe a ação da enzima ACC oxidase, envolvida na síntese de etileno, impedindo desta forma seu acúmulo nos vegetais (GLICK et al., 2007).

A solubilização do fosfato representa mais um mecanismo de promoção do crescimento em plantas não-leguminosas por rizóbios. O fosfato está envolvido em diversos processos metabólicos como a fotossíntese, transferência de energia, transdução de sinal, biossíntese de macromoléculas e a respiração (KHAN et al., 2010), porém o fosfato não pode ser assimilado diretamente pelas plantas. Para a sua solubilização, os microrganismos associativos liberam compostos de dissolução mineral como: ácidos orgânicos (Ácido 2-cetoglucônico, ácido glutâmico, ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido carbônico) e enzimas extracelulares (fosfodiesterase) que atuam na mineralização do fosfato orgânico (SHARMA et al., 2013). Além de favorecer a assimilação do fosfato, foi observado um aumento na concentração de nutrientes como Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio, Zinco, Sódio, Molibdênio e Ferro em plantas não-leguminosas colonizadas com espécies de rizóbios associativos (YANNI et al, 2001).

Outro mecanismo muito explorado em bactérias associativas é produção de antibióticos, sideróforos, enzimas hidrolíticas entre outros compostos, na proteção do hospedeiro contra fitopatógenos (TARIQ et al.;

2014). Os sideróforos, quelantes específicos de Fe (III), sequestram o Ferro da rizosfera, tornando-o menos disponível para os fitopatogênos, enquanto que, algumas enzimas liberadas pelos microrganismos como a quitinase, degradam a parede celular de fungos que possam prejudicar a planta. O emprego destes mecanismos no controle de doenças, além de levar a uma redução do uso de fertilizantes químicos e pesticidas, proporciona uma melhor fertilidade do solo.

Alguns estudos demonstraram que fatores Nod produzidos por rizóbios induziram a restauração da divisão celular e embriogênese na ausência de auxinas e citocininas em plantas não leguminosas como milho e algodão (DYACHOK et al., 2000), além destes fatores serem reconhecidos por plantas como o tomate (STAEHELIN et al., 1994). Outro benefício relatado, refere-se ao alívio do estresse hídrico proporcionado por BPCV (ALAMI et al., 2000), isso ocorre por meio da alteração da condutância estomática das folhas (MATIRU e DAKOTA, 2005) e alterações na morfologia da raiz, proporcionando um uso mais eficiente da água, nutrientes causando assim, maior tolerância à seca (ANYIA et al., 2004).

Diante das inúmeras vantagens apresentadas, as bactérias associativas são ótimas opções a serem testadas em inoculantes de culturas não-leguminosas, devendo esta área ser mais explorada.

### 3.6 TAXONOMIA DE RIZÓBIOS

A taxonomia envolve a classificação, nomenclatura e caracterização dos microrganismos, oferecendo uma melhor compreensão das relações dos organismos com o ambiente. As primeiras identificações eram baseadas na morfologia bacteriana (SCHLEIFER, 2009), anos depois, propriedades bioquímicas também foram incluídas seguindo o Manual Bergey de Determinação Bacteriológica (1923). A partir da década de 1960, o emprego de técnicas de caracterização genotípica promoveu um grande avanço nos estudos de taxonomia microbiana. Atualmente, as pesquisas de novas espécies bacterianas adotam uma abordagem polifásica, onde são avaliadas as características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas.

Os níveis de classificação taxonômica bacteriana consistem no domínio, compreendendo Archaea e Bacteria. Para cada Domínio são descritos

os Filos, Classes, Ordens, Família, Gêneros, Espécies e Subespécies, seguindo as regras internacionais descritas pelo “International Code of Nomenclature of Bacteria” (VANDAMME et al., 1996).

*Rhizobiaceae* Conn 1938 é uma família que pertence à ordem das *Rhizobiales* e classe das *Alphaproteobacteria*, constituída atualmente pelos seguintes gêneros: *Rhizobium* (*Agrobacterium* e *Allorhizobium*), *Carpophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Kaistia*, e *Shinella* (PARTE, 2014). Entre os citados, o gênero *Rhizobium* contém o maior número de espécies.

A família *Rhizobiaceae* em sua primeira classificação era constituída apenas pelo gênero *Rhizobium*. Os primeiros microrganismos foram isolados a partir de nódulos radiculares em plantas leguminosas por Beijerinck (1888) e nomeados como *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889), considerada a espécie tipo do gênero (WILLEMS, 2006). As primeiras descrições de espécies tinham como base a planta hospedeira onde os microrganismos eram isolados. Porém, este conceito foi modificado após a comprovação de que uma leguminosa poderia abrigar diferentes espécies de rizóbios (TEREFEWOR et al., 2001). Na década de 1980, Jordan baseado em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, reclassificou algumas espécies de rizóbios com base em seu tempo de crescimento. As bactérias de crescimento lento formaram um novo gênero conhecido como *Bradyrhizobium*. Em outro estudo, Jarvis e colaboradores (1986) analisaram cístrons de rRNA das espécies *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, confirmando uma disparidade filogenética existente entre os gêneros.

Com a aplicação da taxonomia polifásica, o gênero *Rhizobium* foi subdividido. Chen e colaboradores (1988), utilizando métodos de hibridização DNA-DNA, em estirpes do gênero *Rhizobium* de rápido crescimento isolados em soja, definiram por uma reclassificação destes microrganismos em um novo gênero, o *Sinorhizobium*. Desta forma, a espécie *Rhizobium fredii* foi renomeada para *Sinorhizobium fredii*. Além deste, a análise polifásica permitiu a criação de outros gêneros como: *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; LINDSTROM et al., 1995) e *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998).

Os estudos filogenéticos baseados nas sequências 16S RNAr, provocaram uma nova classificação no gênero *Rhizobium*. As análises

revelaram uma maior proximidade filogenética das espécies *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Allorhizobium*, classificando-as na família *Rhizobiaceae* junto com o gênero *Sinorhizobium*. Os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, foram posicionados mais distantes e passaram a pertencer às famílias *Hyphomicrobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Phyllobacteriaceae*, respectivamente (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

### Gênero *Rhizobium*

O *Rhizobium* foi o primeiro gênero descrito de bactérias que formam nódulos em raízes (FRANK, 1889). Atualmente são consideradas 100 espécies (<http://www.bacterio.net>), sendo *Rhizobium leguminosarum* a estirpe tipo do gênero.

Alguns autores incluíram os gêneros *Agrobacterium* e *Allorhizobium* no gênero *Rhizobium*, surgindo assim novas espécies como: *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* e *R. vitis*. Outras espécies do gênero são: *R. elti*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardini*, *R. hainanense*, *R. hautlence*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. mongolense*, *R. tropici*, *R. acidisoli*, *R. alkalisoli*, *R. alvei*, *R. azibense*, *R. borbori*, *R. calliandrae*, *R. capsici*, *R. cauense*, *R. cellulosityticum*, *R. ciceri*, *R. daejeonense*, *R. endophyticum*, *R. endolithicum*, *R. fabae*, *R. flavum*, *R. freirei*, *R. grahamii*, *R. halophytocola*, *R. helianthi*, *R. herbae*, *R. huakuii*, *R. jaguaris*, *R. ipomoeae*, *R. laguerreae*, *R. larrymoorei*, *R. lemnae*, *R. loessense*, *R. loti*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. marinum*, *R. mayense*, *R. mediterraneum*, *R. meliloti*, *R. mesoamericanum*, *R. mesosinicum*, *R. metallidurans*, *R. miluonense*, *R. multihospitium*, *R. nepotum*, *R. oryzae*, *R. pakistanense*, *R. paknamense*, *R. petrolearium*, *R. phaseoli*, *R. pisi*, *R. puerariae*, *R. pseudoryzae*, *R. pusense*, *R. selenitireducens*, *R. skierniewicense*, *R. soli*, *R. sophorae*, *R. sophoriradicis*, *R. sphaerophysae*, *R. subbaraonis*, *R. sullae*, *R. taibaishanense*, *R. tarimense*, *R. tianshanense*, *R. tibeticum*, *R. trifolii*, *R. tubonense*, *R. vallis*, *R. vignae*, *R. yanglingense* e *R. yantingense* (LPSN, 2017).

Nos últimos anos algumas espécies foram identificadas como: *R. anhuiense* (ZHANG et al. 2015) isoladas de nódulos de fava (*Vicia faba*) e

ervilha (*Pisum sativum*); *R. lentis*, *R. bangladeshense* e *R. binae* (RASHID et al. 2015) isoladas de lentilha (*Lens culinaris*); *R. ecuadorensis* (RIBEIRO et al. 2015) isolado de feijão equatoriano (*Phaseolus vulgaris* L.); *R. paranaense* (DALL'AGNOL et al. 2014) isolado de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.); *R. leucaenae* (RIBEIRO et al., 2012) isolado de nódulos da planta *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*).

Outras espécies foram encontradas em plantas não leguminosas como: *R. oryzicola* (ZHANG et al. 2015) isolada no arroz; *R. smilacinae* (ZHANG et al. 2015) isolada na planta *Smilacina japônica*; *R. lemnae* (KITTIWONGWATTANA e THAWAI 2014,) isolada endofiticamente de *Lemna aquinoctialis*; *R. populi* (ROZAHON et al. 2014) isolado endofítico de *Populus euphratica*; *R. rhizoryzae* (ZHANG et al. 2014) isolado de raízes de arroz e *R. straminoryzae* (LIN et al. 2014) isolado da palha de arroz; *R. alamii* (BERGE et al., 2009) isolado da rizosfera de plantas não-leguminosas.

#### Gênero *Ensifer*

O gênero *Ensifer* (sin. *Sinorhizobium*) foi isolado pela primeira vez por Casida (1982), possui 18 espécies identificadas, sendo *E. fredii* a espécie tipo. As bactérias do gênero medem cerca de 2 µm, possuem motilidade através de 3 a 5 flagelos, suas colônias apresentam um tamanho de 10 a 15 mm de diâmetro, de coloração creme, circulares com margens onduladas, convexas, viscosas, úmidas e opacas. A temperatura ótima de crescimento das espécies fica em torno de 30 °C e o pH de 6 a 7. Os microrganismos são aeróbicos e o crescimento é inibido em 4% de NaCl. As espécies do gênero utilizam várias fontes de carbono, reduzem nitritos e nitratos, porém não fixam N (GARCIA et al., 2012).

Algumas espécies do gênero *Ensifer* se destacam como: *E. meliloti* (DANGEARD 1926; YOUNG 2003) isolado da planta *Medicago truncatula*; *E. terangaie* (DE LAJUDIE et al. 1994 ; YOUNG 2003) isolado da planta leguminosa *Acacia laeta*, típica do continente africano. As novas espécies descritas são: *E. americanos* isolados de raízes de plantas do gênero *Acacia* spp., nativas do México; *E. morelensis* isolados da *Leucaena* (*Leucaena*

*leucocephala*); *E. psoraleae* isolada da planta nativa da Índia conhecida como Babchi (*Psoralea corylifolia*) e *E. sesbaniae* isolado da planta nativa da Índia, conhecida como ervilha Sesbania (*Sesbania cannabina*) (WANG et al. 2013).

Incluídas no gênero *Enfiser*, as bactérias do grupo *Sinorhizobium* se apresentam na forma de bastonetes de até 3 µm de comprimento. Suas colônias medem de 2 a 4 mm de diâmetro, consideradas de rápido crescimento. O gênero contém estirpes que toleram uma ampla faixa de temperaturas entre 10 °C a 44 °C, altos valores de pH entre 10 a 11 e concentração de até 4,5% de NaCl. A primeira bactéria do gênero foi isolada por Scholla e Elkan (1984) em raízes de plantas leguminosas, atualmente são conhecidas 11 espécies de *Sinorhizobium*. Estes organismos são capazes de formar nódulos em raízes de leguminosas de zonas tropicais, fixando N através da simbiose. Apenas as características fenotípicas não distinguem os gêneros *Sinorhizobium* e *Rhizobium*. Por isso, pesquisadores compararam o gene ribossomal 16S, constando a diferença entre os gêneros. Estudos do gene 16S rRNA da estirpe *E. medicare* WSM 419 demonstraram maior semelhança com as espécies *E. meliloti* e *E. fredii*, em comparação com sequências de outros gêneros relacionados como *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, e *Rhizobium* (REEVE et al. 2010).

Outros gêneros conhecidos como rizóbios, mas classificados em outras famílias são: *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

#### Gênero *Mesorhizobium*

O gênero *Mesorhizobium* foi proposto em 1997 por Jarvis, constituindo inicialmente a família *Rhizobiaceae*. Contudo, outras análises revelaram que o gênero mostrou maior proximidade filogenética da família *Phyllobacteriaceae*, sendo incluída no novo grupo. As bactérias do gênero são Gram-negativas, na forma de bastonetes e são aeróbicas (GARCIA, 2012). O gênero *Mesorhizobium* contém 32 espécies das quais se destacam: *M. loti* considerada a estirpe tipo (JARVIS et al. 1982), *M. huakuii* isolado da planta nativa da China conhecida como Ervilhaca Leite Chinesa (*Astragalus sinicus*) (CHEN, 1991), *M. ciceri* (NOUR et al., 1994), *M. mediterraneum* (NOUR et al. 1995), *M. amorphae* isolados da planta conhecida como Arbusto Indigo

(*Amorpha fruticosa*) (WANG et al. 1999), *M. qingshengii* isolados de *Astragalus sinicus* (ZHENG et al. 2013), *M. robiniae* isolados da raiz de Acácia-bastarda (*Robinia pseudoacacia*) (ZHOU et al. 2010), *M. erdmanii* e *M. jarvis* (MARTÍNEZ-HIDALGO et al. 2015), entre outras espécies.

#### Gênero *Azorhizobium*

Os microrganismos do gênero *Azorhizobium* pertencem à família *Hyphomicrobiaceae* e possuem apenas 3 espécies descritas. As espécies se apresentam na forma de bastonetes semelhantes aos microrganismos do gênero *Rhizobium*, crescem a uma temperatura de até 43 °C e utilizam apenas a glicose como carboidrato. As espécies conhecidas são: *Azorhizobium caulinodans*, estirpe tipo isolada do caule da planta leguminosa conhecida na Índia como Manila Agathi (*Sesbania rostrata*) (DREYFUS et al., 1988), *A. doebereineriae* isolada de uma leguminosa conhecida como Cambaí-amarelo (*Sesbania virgata*) (MOREIRA et al. 2006) e *A. oxalatophilum* (LANG et al. 2013).

#### Gênero *Bradyrhizobium*

O gênero *Bradyrhizobium* pertence à família *Bradyrhizobiaceae*, possui 33 espécies descritas e este gênero foi criado inicialmente para classificar rizóbios de crescimento lento. A espécie *Bradyrhizobium japonicum*, estirpe tipo do gênero, foi a primeira espécie isolada por Kirchner em 1896.

Os microrganismos do gênero são descritos como Gram-negativos, na forma de bastonetes, de tamanho variável entre 0,5-0,9 a 1,2-3 µm e mobilidade por um flagelo. As colônias são superiores a 1 mm de diâmetro, crescem a uma temperatura ótima de 30 °C e utilizam diversos tipos de açúcares (VINCENT, 1970). Algumas espécies podem fixar N e crescer em ambientes com pouco oxigênio (GARCIA et al., 2012).

Exemplos de espécies isoladas do gênero são: *B. elkanii*, *B. liaoningensis* isolado em raízes de soja (XU et al., 1995); *B. yuanmingense* isolado a partir da planta do gênero *Lespedeza* (YAO et al., 2002; EUZÉBY et

al., 2004); *B. betae* isolado das raízes de *Beta vulgaris* conhecida como beterraba (RIVAS et al., 2004); *B. lablabi* isolado a partir da planta *Lablab purpureus* conhecida como Lablab (TRINICK, 1980); *B. cytisi* isolado a partir da *Cytisus villosus*, conhecida como vassoura negra, com prevalência na Espanha e Norte da África (CHAHBOURNE et al., 2011); *B. pachyrhizi* isolado a partir de nódulos de *Pachyrhizus erosus*, conhecida popularmente como Jacatupé (RAMIREZ-BAHANA et al., 2009).

Outras espécies isoladas incluem: *B. daqingense* isolados partir de *Glycine max* (WANG et al., 2013); *B. pachyrhizi* e *B. oligotrophicum* isolados a partir de *Pachyrhizus erosus* (RAMIREZ-BAHANA et al., 2013); *B. lupini* (PEIX et al. 2015) isolado da planta do gênero *Lupinus*, onde a espécie *Lupinus albus* é conhecida como Tremoceiro; *B. erythrophlei* e *B. ferriligni* (YAO et al. 2015) isolado da leguminosa *Erythrophleum fordii*, árvore nativa da China.

### 3.7 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS, GENOTÍPICAS E FILOGENÉTICAS DO GÊNERO *RHIZOBIUM*

#### 3.7.1 Características Fenotípicas

Os métodos fenotípicos se baseiam na descrição morfofisiológica dos procaríotos, sendo indispensável nos estudos taxonômicos de rizóbios. (LEITE et al., 2009; MELLONI et al., 2006). As características morfológicas incluem a forma bacteriana, presença/ausência de flagelos, corpos de inclusão e coloração de Gram. A descrição bioquímica considera resultados do crescimento microbiano em diferentes condições como: valores de pHs, temperaturas, concentrações de sais, diferentes fontes de carbono e presença de antibióticos.

Microrganismos do gênero *Rhizobium*, são bacilos móveis de tamanho variável de 0,5 - 1 a 1,2 - 3,0 µm, aeróbicos, Gram-negativos e não formam esporos. Suas colônias medem de 2 a 4 mm de diâmetro dentro de 3-5 dias em ágar de sais minerais de levedura-manitol (YMA), são circulares, com bordas inteiras, convexas, de coloração creme, aparência mucóide e superfície pouco brilhante (GRAHAM E PARKER 1964; ELBANNA et al 2009;

KUYKENDALL et al., 2015). A turbidez se desenvolve após 2 ou 3 dias em caldo aerado ou agitado. As temperaturas ótimas de crescimento variam de 25 °C a 30 °C, entretanto, algumas espécies foram encontrados na Austrália e China em zonas de altas temperaturas, superiores a 40°C, (YATES et al 2004; WEI et al 2008). O pH ideal de crescimento fica na faixa de pH entre 6,0 a 7,0 (JORDAN, 1984; KUYKENDALL et al., 2015) porém, algumas espécies como *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium sp.* apresentam bom desenvolvimento em pHs abaixo de 5,0 (GRAHAM et al., 1994; HUNGRIA e VARGAS, 2000). Algumas espécies como *Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae* toleram faixas de pHs entre 3,5 a 9,5 (ELBOUTAHIRI et al., 2010). O tempo de geração das estirpes de *Rhizobium* são de 1,5-5,0 h. As espécies do gênero apresentam ampla tolerância à salinidade, concentrações de 1% até 3% de NaCl (FTRICH, et al 2011; KUYKENDALL et al., 2015), outras estirpes são muito sensíveis, conseguindo sobreviver em meios com apenas 0,5% NaCl (ELBANNA et al., 2009). As espécies do gênero utilizam uma grande variedade de carbonos e sais de ácidos orgânicos como únicas fontes de carbono, sem formação de gás. Produzem uma reação ácida em meio de sais minerais contendo manitol ou outros carboidratos. Os sais de amônio, nitrato, nitrito e a maioria dos aminoácidos podem servir como fontes de nitrogênio. As estirpes de algumas espécies crescem em meio de sais minerais simples com hidrolisado de caseína, sem vitamina, como única fonte de carbono e nitrogênio, mas as estirpes de muitas espécies requerem um ou mais fatores de crescimento, como biotina, pantotenato ou ácido nicotínico. A peptona é pouco utilizada. A caseína, o amido, a quitina e o ágar não são hidrolisados (KUYKENDALL et al., 2015). Outro importante teste realizado é a capacidade do microrganismo em solubilizar fosfato (RIVAS et al., 2009), buscando identificar rizóbios com capacidade de atuar com BPCV. Todas as espécies conhecidas de *Rhizobium* incluem cepas que induzem hipertrofismos nas plantas como nódulos radiculares com ou sem fixação de nitrogênio simbiótica (KUYKENDALL et al., 2015).

Outras técnicas podem ser aplicadas na caracterização fenotípica, como as análises quimiotaxonômicas que permitem identificar a composição celular procariótica. Algumas destas análises são realizadas pela caracterização de componentes específicos de parede e membranas celulares,

como açúcares de parede celular, ácidos graxos celulares, lipídeos polares, conteúdo de G+C (guanina e citosina) do DNA, polissacarídeos extracelulares e aplicação de metodologias de *fingerprinting* químico (pirólise-espectrometria de massas, caracterização de metabólitos celulares totais por HPLC) (MANFIO, 2003).

O método SDS-PAGE permite analisar as proteínas totais por meio da eletroforese, sendo utilizada para distinguir estirpes de rizóbios muito relacionadas (VANDAMME et al., 1996). Esta técnica foi empregada por Lima et al. (2005) em estudos descritivos de espécies de *Bradyrhizobium* spp. isoladas na Amazônia.

A ELISA (Enzyme-linked Imuno Sorbent Assay) é um método sorológico que identifica os constituintes antigênicos das células pela ação de enzimas (NISHI, 1994), utilizada na caracterização de estudos taxonômicos. A análise de perfil de ácidos graxos foi aplicada por Kay e colaboradores (1994) na distinção de estirpes de *Bradyrhizobium* e *R. meliloti* isolados em solos italianos. Graham & Vance (2000) encontraram rizóbios isolados de *Dalea purpúrea* e *Dalea candida* nos Estados Unidos, apresentando similaridade quanto a ácidos graxos com cepas de *R. gallicum* procedentes da França. Tighe e colaboradores (2000) analisaram o perfil de ácidos graxos de rizóbios dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* utilizando a metodologia Sherlock. Delamuta e colaboradores (2013) empregaram a mesma metodologia na descrição de espécies do gênero *Bradyrhizobium*.

Os resultados dos testes em que os microrganismos foram submetidos refletem a sua capacidade de adaptação no ambiente em que foi isolado (ELBOUTAHIRI et al. 2010). Com isso, é possível classificar as estirpes bacterianas, além de conhecer melhor as suas condições de crescimento. Os dados fenotípicos obtidos, comparado com as características genotípicas e filogenéticas, formam um conjunto de informações necessárias para a taxonomia de microrganismos.

### 3.7.2 Características Genotípicas

A "abordagem polifásica", onde se combinam técnicas de caracterização genotípica, filogenética e fenotípica, está sendo adotada em estudos diversidade bacteriana em todo o mundo.

Técnicas de biologia molecular são empregadas, de forma geral, em estudos de caracterização genotípica, consideradas de grande contribuição para a taxonômia. Algumas técnicas utilizadas na descrição da diversidade microbiana, incluindo rizóbios são: conteúdo de bases nucleotídicas de DNA (% G + C), métodos de rep-PCR, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), hibridização DNA-DNA (homologia DNA- DNA) e PCR-RFLP (*Restrictions Fragment Length Polymorphism*)(VANDAMME et al., 1996; CHUEIRE et al., 2000; FERNANDES et al., 2003;GRANGE et al., 2007; CAUWENBERGHE et al., 2014).

#### Rep-PCR, RAPD e RFLP

O método de rep-PCR faz o uso de *primers* (oligonucleotídeos) específicos que amplificam sequências repetidas do DNA pela técnica de PCR, proporcionando a formação de perfis eletroforéticos que promovem a chamada impressão digital do organismo (*fingerprinting*). Os marcadores mais utilizados são REP-PCR (35-40 pb) (MISHRA et al., 2012), ERIC-PCR (124-127 pb) (RASHID et al., 2012) e BOX-PCR, que consiste de 154 pb e três subunidades (box a, b e c) (ROWS et al., 2014). Estes métodos são uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética em nível de espécie (CHUEIRE et al., 2000; FERNANDES et al., 2003;), fornecendo uma análise complementar à caracterização por outras metodologias. No caso de bactérias diazotróficas, recomenda-se a obtenção de perfis de rep-PCR, devido essa técnica ser reconhecida como uma metodologia oficial para a identificação de rizóbios visando à produção de inoculantes comerciais.

A impressão digital da técnica BOX-PCR foi usada para separação de estirpes muito relacionadas como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (LIU et al., 2005). Em outras análises com rep-PCR, as espécies estudadas foram: *B. japonicum* (JUDD et al., 1993; VINUESA et al., 1998), *R. tropici* (VAN

BERKUM et al., 1994), *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (LEUNG e BOTTOMLEY, 1994), *R. galegae* (SELENSKA-POBELL et al., 1995) e *R. meliloti* (DE BRUIJN, 1992; ROSSBACH et al., 1995). Foi relatado também, o uso da técnica ERIC-PCR em estudos com estipes do gênero *Rhizobium* isoladas de lentilha (RASHID et al., 2014) e sua aplicação na diferenciação de estirpes de *R. leguminosarum* (LAGUERRE et al., 2003, MOSCHETTI et al., 2005) .

Na técnica RAPD se utiliza um único primer de sequência aleatória e de baixa especificidade, gerando assim, um grande número de fragmentos amplificados por PCR. As sequências são identificadas por marcadores moleculares informando o nível de polimorfismo. A técnica de RAPD-PCR é um pouco mais discriminatória e rápida que a metodologia ERIC-PCR, as impressões digitais podem ser obtidas com mais facilidade (SIKORA et al., 1997). Alguns estudos aplicaram a técnica RAPD na caracterização de isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* tanto em culturas puras quanto em nódulos (DE BRUIJN, 1992; HARRISON et al., 1992; JUDD et al., 1993; LOUREIRO, 1994; VERSALOVIC et al., 1994; SADOWSKY & MOAWAD, 1995). Niemann e colaboradores (1997) em um estudo comparativo, observaram o poder de resolução dos métodos de RAPD e ERIC na discriminação de estirpes de *R. meliloti*.

A metodologia PCR-RFLP permite a análise de polimorfismos em pequenas sequências amplificadas por PCR, digeridas por enzimas de restrição. O espaço intergênico (16S-23S) amplificado por PCR tem sido alvo de trabalhos com RFLP, método empregado pela sua rapidez e habilidade em estabelecer as relações filogenéticas dos rizóbios (PAFFETTI et al., 1996; WANG et al., 2006).

Em estudos com *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, a técnica RFLP revelou a diversidade genética de isolados desta espécie (DEMEZAS et al., 1991). Van Damme et al., (1996) demonstraram a eficiência da técnica RFLP em trabalhos de diversidade intra-específica de rizóbios, o mesmo foi observado em outras pesquisas por Selenska-Pobell et al.(1996), Chueire et al.,( 2000), Daignon-Bourcier et al.( 2000), Tan et al.,( 2001) e Fernandes et al.(2003); e Porém, quando se considera dois gêneros diferentes de rizóbios, o poder de discriminação intraespecífica de RFLP pode ser extremamente baixo (JENSEN et al., 1993; PAFFETTI et al., 1996).

### Conteúdo DNA (%G+C)

O conteúdo de guanina mais citosina do genoma (%G+C) é considerado um indicativo de identidade filogenética de uma bactéria e uma ferramenta padrão na distinção de gêneros e espécie de microrganismos, especialmente na distinção de cepas com similaridade fenotípica (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). O conteúdo (%G+C) é adotado na taxonomia há muitos anos, utilizada em livros como o *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Os valores de genomas de procariotos varia de 16% a 75% (LIGHTFIELD et al, 2011), apesar desta variação, o conteúdo das estirpes de uma espécie particular é constante. O conteúdo (%G+C) de espécies do gênero *Rhizobium* varia de 57% a 66% (KUYKENDALL et al., 2015).

As cepas da mesma espécie podem ter uma variação de 3% no teor de G + C e não mais de 10% para os membros de um gênero (VANDAMME, 1996). Porém, não é seguro assumir que organismos com conteúdo (%G+C) bastante semelhantes, também apresentam sequencias de bases de DNA semelhantes, pois duas sequências de bases bastante diferentes podem ser construídas a partir das mesmas proporções de AT e GC. Apenas se dois microrganismos forem semelhantes filogeneticamente é que o seu conteúdo G+C sugere uma relação. Os dados do conteúdo de G+C são relevantes, se as informações taxonômicas obtidas forem confirmadas por outros métodos, levando em consideração que a variação dentro de um gênero é normalmente inferior a 10%, enquanto que a diferença entre gêneros é bastante superior a este valor. Os valores do conteúdo G + C são estimados a partir das propriedades físicas induzidas no DNA extraído e/ou digerido, ou seja, os nucleotídeos não são calculados (MEIER-KOLTHOFF et al, 2014).

### Hibridização DNA-DNA

A hibridização DNA-DNA (DDH) foi baseada na capacidade das moléculas de DNA de cadeia simples hibridizarem com base na homologia entre dois genomas. Um valor de 70% recombinação DNA-DNA é considerado como o limiar para a demarcação de espécies bacterianas, equivalente a 5 ° C

da temperatura de melting ( $\Delta T_m$ ), ambos os valores devem ser considerados (WAYNE et al, 1987). Quanto maior a similaridade dos genomas, maior será a temperatura de melting necessária para separar as fitas novamente. Estirpes que possuem uma hibridização variando entre 25 e 60% são consideradas espécies diferentes pertencentes ao mesmo gênero e percentuais inferiores a 10% compreendem gêneros distintos (WANG et al., 2006). A maior parte das espécies de rizóbios foi definida obedecendo a estes critérios. A hibridização empregada em estudos de Martinez-Romero (1994) relatou casos de baixa homologia de DNA entre as espécies *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium plurifarum*. Apesar de ser amplamente utilizada em laboratórios, a técnica de hibridização não permite a elaboração de um banco de dados que permita a recuperação de informações para futuras comparações e análises (RICHTER & ROSSELLÓ-MÓRA 2009; RAMOS et al., 2011) além disso, os resultados da DDH podem variar entre diferentes laboratórios (CHO E TIEDJE, 2001 e LINDSTRÖM et al, 2015).

### 3.7.3 Características Filogenéticas

O sequenciamento dos genes 16S rRNA e *housekeeping* são frequentemente realizados na caracterização filogenética de microrganismos (VANDAMME et al., 1996). As sequências são alinhadas e comparadas com base em sua similaridade, se duas sequências apresentam grande similaridade, demonstram fortes indícios de possuírem o mesmo ancestral, ou seja, serem homólogas (AMABIS & MARTHO, 1990). A similaridade é simplesmente uma forma de expressar o quanto duas sequências são parecidas, seu valor é baseado na identidade e/ou conservação da sequência. Os valores de identidade nucleotídica obtidos nas comparações, indicam a quantidade de nucleotídeos alinhados, ou seja, o quanto eles são idênticos.

#### Gene ribossomal 16S

A taxonomia de procariontes sofreu uma revolução na década de 1970, quando o uso do gene 16S rRNA foi incluído em análises filogenéticas por Carl Woese (OREN, 2009). A utilização do gene 16S rRNA na década de

1990 resultou em um aumento significativo no número de descrições de novas espécies (TAMAMES & ROSSELLÓ-MÓRA, 2012). O número de sequências disponíveis nos repositórios públicos aumentou de 10000 no ano 2000, para 250000 e 3000000 nos anos 2004 e 2012, respectivamente. Atualmente, relatar uma sequência quase completa do gene rRNA16S é necessário para a descrição de novo táxon bacteriano.

Os genes ribossomais (rRNA) estão entre as moléculas mais conservadas durante a evolução em todos os seres vivos, devido a sua função estrutural nos ribossomos. Apesar de altamente conservados, apresentam variabilidade genética em alguns domínios, tornando as sequências ribossomais proveitosas para a caracterização filogenética (GARRITY e HOLT, 2001). O gene 16S podem ser sequenciado facilmente e comparado com outras milhares de sequências depositadas em bancos de dados. Os valores de similaridades de 97% e 95% foram definidas como limites para estirpes pertencentes à mesma espécie e gênero, respectivamente (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; BORNEMAM e TRIPLETT, 1997).

SEGOVIA et al. (1993) e YONG et al. (1991) propuseram a análise da distância filogenética entre estirpes de *Rhizobium* através do sequenciamento do gene 16S rRNA. LAGUERRE et al (1994) demonstraram a utilização de sequências iniciadoras da região do gene ribossomal 16S na identificação de gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*. Além de diversos outros trabalhos com rizóbios realizados por YOUNG et al. 1991; EARDLY et al., 1992; LAGUERRE et al., 1993; AMARGER et al., 1997; VINUESA et al. 1998; CHUEIRE et al., 2000; LAFAY et al., 2001; MOSTASSO et al., 2002; CHUEIRE et al., 2003; GRANGE; HUNGRIA, 2004; YOUNG et al., 2004; SILVA et al., 2005; VINUESA et al., 2005; MENNA et al., 2006.

Apesar de essencial, apenas o gene 16S rRNA não é suficiente para a descrição de novas espécies (STACKEBRANDT e GOEBEL 1994; TINDALL et al, 2010). O número de corte para a similaridade do gene 16S rRNA, não pode ser aplicado como um limite padrão para todas as bactérias e o gene ribossomal pode ser ocasionalmente sujeito a transferência horizontal e recombinação genética, assim, a filogenia de 16S rRNA pode não refletir a correta filogenia das bactéria (VAN BERKUM e FUHRMANN 2000, WILLEMS

2001, VAN BERKUM et al, 2003, EARDLY et al, 2005, VINUESA et al, 2005, MARTENS et al, 2007 & 2008, THOMPSON et al, 2013).

Embora os dados obtidos com a sequência do gene 16S rRNA permita identificar um microrganismo ao nível de gênero, não é muito eficiente na diferenciação de espécies (MIGNARD e FLANDROIS, 2006). Portanto, os pesquisadores passaram a utilizar outras ferramentas para complementar a esta análise, como a metodologia MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*), que compara as sequências de genes *housekeeping* das estirpes bacterianas.

#### MSLA (*Multi-Locus Sequence Analysis*)

Gevers et al., (2005) definiram MLSA como um método para a caracterização genotípica de um grupo mais diverso de procaríotos, usando as sequências de múltiplos genes de manutenção codificadores de proteínas. Os genes “*housekeeping*” codificam proteínas envolvidas na manutenção fisiológica de procaríotos (KRAWIEC e RILEY 1990; HARRISON et al 2010). Esses genes têm funções altamente limitadas e mudaram pouco ao longo do tempo (WOESE, 1992, VINUESA et al., 2005, JANDA E ABBOTT, 2007). Os genes “*housekeeping*” são considerados marcadores adequados para a filogenia microbiana, pois, apesar de evoluírem, possuem sequências conservadas a ponto de oferecer informações que auxiliem nos estudos filogenéticos.

Os genes “*housekeeping*” mais empregados em estudos com rizóbios são: DNA recombinase A (*recA*) (VINUESA et al., 2005) que codifica a proteína responsável pela recombinação homóloga em bactérias; *glnII* e *glnA* (SILVA et al., 2005) que codificam as enzimas glutamina sintase GSI e GSII, respectivamente; *atpD* (VINUESA et al., 2005) que codifica a subunidade  $\beta$  da ATP sintase; *rpoB* (KHAMIS et al., 2003) que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase e o gene *dnaK* (EARDLY et al., 2005) que codifica uma chaperona envolvida em vários processos celulares. Além destes, os genes *nod* (nodulação) e *nif* (fixação) são frequentemente utilizados na caracterização de rizóbios (HAUKKA et al., 1998; LAGUERRE et al., 2001), juntamente com o gene ribossomal 16S rRNA.

Vinuesa et al., (2005) demonstraram que os genes “*housekeeping*” serviram adequadamente para a técnica MLSA e na caracterização filogenética de várias espécies. Da mesma forma em estudos com *Rhizobium* (LI, 2016); *Bradyrhizobium* (RIVAS et al., 2009), *Ensifer* (MARTENS et al., 2008), *Mesorhizobium* (WOLDE-MESKEL et al.,2005). A seleção dos genes apropriados é importante para estimar a filogenia com base em sequências de genes concatenados. O comitê que avalia a definição de espécies em bacteriologia sugeriu usar um mínimo de cinco genes de manutenção em MLSA (STACKEBRANDT et al., 2002). Outros autores como Konstantinidis et al, (2006) propuseram um mínimo de três genes para estudos de diversidade microbiana com MLSA. Estudos filogenéticos com estirpes do gênero *Rhizobium*, conduzidos por Jiao Y. S. (2015), Zou L. (2016), Lu J. (2011) e colaboradores, obtiveram sucesso na descrição de espécies utilizando três genes *housekeeping* na análise por MLSA.

O método MLSA tornou-se a abordagem preferida para as análises taxonômicas na última década, devido à diminuição dos custos de sequenciamento de genes, e também, pelo aperfeiçoamento dos programas de bioinformática. Considerada pelas suas vantagens, a melhor metodologia disponível para os estudos taxonômicos.

#### ANI (*Average nucleotide identity*)

A técnica *Average Nucleotide Identity* tem sido adotada por diversos estudos descritivos nos últimos anos. Esta abordagem conhecida como ANI (KONSTANTINIDIS e TIEDJE, 2005), fornece informações baseadas na comparação do genoma inteiro entre dois organismos e foi recentemente aceita como uma alternativa ao método tradicional de hibridização DNA/DNA. O ANI avalia um grande número de genes, de lenta e rápida evolução, isto minimiza o efeito da transferência horizontal de genes, fazendo com que seja considerado o método de maior resolução para estudos descritivos (KONSTANTINIDIS e TIEDJE, 2005). O valor de ANI igual a 95%, equivale ao valor de 70% de DDH (CHAN et al., 2012, KONSTANTINIDIS E TIEDJE, 2005), ou seja, pertencem a mesma espécie de procaríoto. Os cálculos de ANI podem ser determinados com o auxílio de softwares, onde os dados genômicos são

comparados e utilizados para fins taxonômicos. As descrições de espécies onde ANI foram utilizadas para suportar ou complementar os valores de hibridização DNA/DNA foram publicados por Dall'agnol et al. (2013) (2014), Delamuta et al. (2013) e López-López et al. (2012). Da mesma forma, o emprego da metodologia ANI levou à descoberta de novas linhagens rizóbios por López-Guerrero et al. (2012) e Ribeiro et al. (2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

As estirpes do gênero *Rhizobium* caracterizadas neste trabalho foram escolhidos após um estudo de descrição iniciado por Zuluaga e colaboradores (2016). Neste estudo, os rizóbios foram isolados a partir de amostras de solo, a rizosfera e o endosfera de raízes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*) cultivados em solos de diferentes tipos de manejo provenientes da fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina. Os solos coletados receberam o seguinte manejo: solo de mata secundária (com vegetação mista arbórea/herbácea), solo de hortícola convencional (com cultura de abóbora) e solo orgânico (sem cultura no momento da amostragem, mas com histórico de cultivo de milho). Estas estirpes foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium* a partir de sequências parciais do gene 16S rRNA nos estudos prévios realizados por Zuluaga e colaboradores (2016). Estes isolados foram armazenados em glicerol a -20 °C e mantidos na coleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal do Laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual de Londrina. Do estudo inicial de descrição, 25 estirpes foram selecionadas para este trabalho, 9 isolados de tomate (*Solanum lycopersicum*); 14 isolados de lulo (*Solanum quitoense*) e do 2 isolados de solo.

As estirpes selecionadas para o estudo foram nomeadas com as letras iniciais segundo as plantas e o meio em que foram isoladas, seguidas de uma abreviação indicando o tipo de solo utilizado no cultivo. Desta forma, os isolados das plantas *Solanum lycopersicum* (tomate), *Solanum quitoense* (lulo) e do solo, receberam a denominação SL, SQ e SO, respectivamente. Os

tipos de solo receberam as seguintes abreviações: Fal. (*fallow*), pousio ou solo de mata; Org. (organic) uso com manejo orgânico; Con. (*conventional*) uso sob manejo convencional (Tabela 1).

**Tabela 1** – Espécies de plantas/meio onde os rizóbios foram isolados e tipos de solos utilizados nos cultivos.

Plantas/meio	Tipos de solo
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) - SL	Fallow – Fal.
<i>Solanum quitoense</i> (lulo) - SQ	Organic – Org.
Solo - SO	Conventional – Con.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 4.2.1 Extração do DNA Total

Os 25 isolados de bactérias do gênero *Rhizobium* mantidos em criopreservação foram reativados pelo cultivo em meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO, et al., 1986.), a 30 °C por 24 horas, sob agitação orbital a 180 rpm. A partir das culturas bacterianas obtidas, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, que passaram por uma centrifugação de 2 min a 12000 g, sendo descartando o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 400 µL de tampão STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0) aos precipitados contendo as células bacterianas, que foram homogeneizados em vórtex por 1 min e centrifugados por 2 min a 12000 rpm. Na amostra homogeneizada, foram adicionados 100 µL da solução fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0, misturadas em vórtex por 1 min, e centrifugadas durante 5 min a 15000 g, provocando a lise das células.

A centrifugação provocou a separação das fases aquosa e orgânica por força centrípeta. Como o DNA bacteriano se encontra na fase aquosa, foram transferidos 160 µL desta fase para um microtubo de 1,5 mL, que recebeu mais 40 µL de tampão TE e 100 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 min e centrifugados por 5 min a 15000 g, este procedimento foi repetido mais 2 vezes até não ser mais possível observar mais a presença de precipitado na interface das amostras.

Dos extratos de DNA obtidos, 160  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 mL, que receberam mais 5  $\mu\text{L}$  da enzima RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas por 10 min a 37 °C para a lise da molécula de RNA. No último passo da extração, cada tubo recebeu 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, seguido de homogeneização em vórtex por 1 min e centrifugação por 5 min a 15000 g, transferiu-se 140  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um microtubo que foi armazenado a -20 °C para ser utilizado nas etapas seguintes.

#### 4.2.2 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação das amostras de DNA ocorreu por meio da técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os *primers* para os genes 16S RNAr e genes *housekeeping recA* (proteína de recombinação RecA), *glnII* (Glutamina sintetase II) e *rpoA* (RNA polimerase subunidade  $\alpha$ ) (Tabela 2). Em cada reação de amplificação foi utilizado uma solução composta de 50 ng de amostra de DNA, 2  $\mu\text{L}$  do primer iniciador de cada região selecionada (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (mistura com 2,5 mM de cada nucleotídeo), 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x (10 mM Tris-HCL pH 8,3), 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1,5 U de Taq DNA polimerase e completando com água ultrapura até o volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

As amostras foram amplificadas utilizando um termociclador, com ciclos de tempo e temperatura específicos para cada primer de acordo com a Tabela 2. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, tampão TBE 0,5 x, onde em cada poço foram aplicados 0,5  $\mu\text{L}$  de cada amostra amplificada diluídas em 0,3  $\mu\text{L}$  do tampão da amostra 6x (Azul de Bromofenol 0,25%, glicerol 30% e tampão TBE 0,5X). A corrida ocorreu a uma voltagem de 60 Volts, à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h. Os produtos de amplificação foram corados com brometo de etídio e o perfil das bandas formadas foi verificado em um foto documentador sob radiação UV. Após a análise, os fragmentos amplificados passaram por uma etapa de purificação prévia à reação de sequenciamento com o kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche), seguindo as instruções do fabricante. Após a análise do produto em gel de agarose, as amostras foram submetidas as reações de sequenciamento.

**Tabela 2 – Primers e condições de amplificação.**

Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Ciclos	pB
16S	Y1	5' -TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC- 3'	1 x (93 °C por 2 min), 35 x (93 °C por 45 seg; 62 °C por 45 seg; 72 °C por 2 min), 1 x (72 °C por 5 min) e (15 °C por 15 min) (YOUNG et al., 1991). 25 a 35 ciclos de 95 ° C (2 min), 42 ° C (30 s) e 72 ° C (4 minutos). (WEISBURG <i>et al.</i> , 1991)	(região 20 a 43 E. coli gene 16S rRNA)
	Y3	5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3'		(região 1487 a 1507 E. coli gene 16S rRNA)
	*362f	5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-'3		1500 pb
	*786f	5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-'3		(região 339 a 362) (região 746 a 786)
recA	recA6f	5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA-3	2 min 95°C, 35X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 90 s 72°C), 7 min 72°C. (STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005)	396 pb
	recA555r	5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT'3		
glnII	TSglnII f	5'-AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG-3'	2 min 95 °C, 35x(45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 1.5 min 72 °C), 7 min 72 °C. (STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005).	480 pb
	TSglnII r	5'-SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG-3'		
rpoA	RRrpoAf	5'-GGAAATCGCCATCAAGATGG-'3	2 min 95 °C, 35 x (45s 95°C, 30s 58°C, 90s 72°C), 7 min 72°C (RIBEIRO <i>et al.</i> , 2009)	603 pb
	RRrpoAr	5'-ACGCTTGCGGAGATCTTC-'3'		

\* primers utilizados no sequenciamento

Em estudos realizados por Zuluaga e colaboradores (2016), foi obtido o perfil BOX das estirpes utilizadas neste trabalho. As amostras de DNA foram amplificadas utilizando o primer BOX AIR, seguindo as condições de amplificação descritas por Kaschuk et al. (2006). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação UV.

As bandas resultantes foram analisadas pelo programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica) utilizando o algoritmo UPGMA (“*unweighted pair-group method with arithmetic mean*”) e o coeficiente de Jaccard a 3 % de tolerância (JACCARD, 1912).

#### 4.2.3 Reações de Sequenciamento e Análise Filogenética

As reações de sequenciamento foram montadas em placas de 96 poços utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems). Em cada poço, foram transferidos 3  $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado; 1  $\mu\text{L}$  dos respectivos iniciadores (20 mM); 1,3  $\mu\text{L}$  do terminador Big Dye; 2,5  $\mu\text{L}$  do tampão 5X e água ultrapura completando para 20  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada utilizando um termociclador estabelecendo um ciclo de desnaturação inicial (96 °C, 1 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (96 °C, 15 seg), anelamento (50 °C, 15 seg) e extensão (60 °C, 4 min).

Após a amplificação, o DNA foi precipitado utilizando 65  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e 2  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio (7,5 M) em cada poço. As placas foram centrifugadas por 45 min a 4000 g. Uma suspensão foi formada onde o sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e centrifugando durante 20 min a 4000 g a 20°C. O sobrenadante foi descartado, a placa foi seca e incubada a 37 °C por 30 min. e o DNA ressuspendido com 10  $\mu\text{L}$  de formamida. O sequenciamento ocorreu utilizando o sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems).

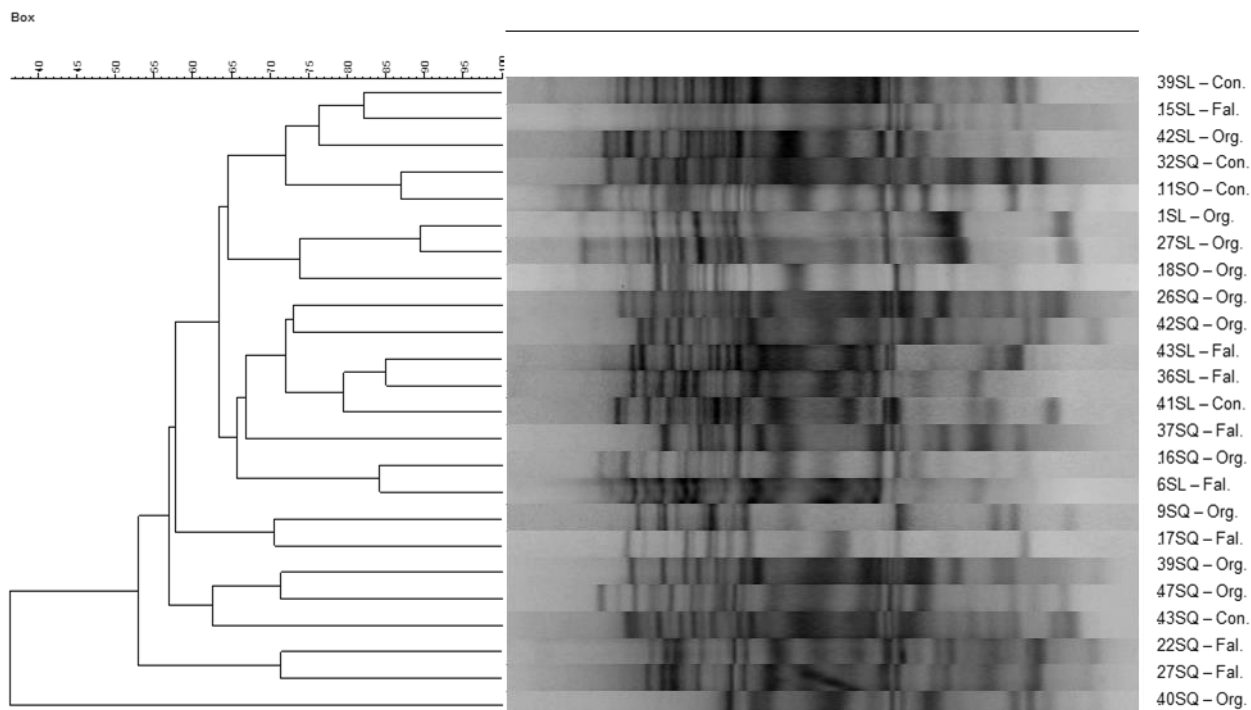
Com o programa Bioedit versão 7.2.5, as sequências obtidas foram corrigidas com base no banco de dados do NCBI e alinhadas com o programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As árvores filogenéticas dos genes 16S RNAr e *housekeeping* foram construídas utilizando o programa MEGA 7, com base no algoritmo Maximum Likelihood (SAITOU; NEI, 1987) e modelo de distância Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992). A identidade nucleotídica entre as estirpes foi calculada pelo programa Bioedit, versão 7.2.5.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 BOX-PCR

Com a observação do dendograma (Figura 1), foi possível notar que todas as amostras apresentaram perfis distintos, excluindo a possibilidade das estirpes estudadas representarem clones. Uma alta diversidade intraespecífica foi observada nas diversas ramificações formadas. Os microrganismos isolados da mesma planta hospedeira apresentaram valores de similaridade superiores a 70%, se agrupando nos mesmos ramos.

Apenas as estirpes 1SL Org., 27SL Org., 22SQ Fal. e 27SQ Fal. se agruparam nos mesmos ramos tanto no dendograma quanto nas árvores filogenéticas, apesar disso a maioria das estirpes que se posicionaram próximas no dendograma, permaneceram nos mesmos grupos nas árvores filogenéticas.



Fonte: Autor

**Figura 1** – Dendrograma construído com base nos perfis eletroforéticos obtidos pela técnica BOX-PCR, com auxílio do programa Bionumerics utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard com 3% de tolerância.

## 5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO 16S DO DNAR

A árvore filogenética estudada com sequências parciais do gene 16S (Figura 2) foi gerada com base no posicionamento das estirpes em um dendograma constituído por todas as 100 espécies tipo do gênero *Rhizobium*, relatadas no banco de dados *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN; <http://www.bacterio.net>) (Anexo A). A árvore estudada compreendeu 32 espécies tipo, onde suas sequências foram alinhadas com as estirpes estudadas e cortadas no tamanho de 1027pb (Figura 2).

O termo técnico utilizado para denominar todo tipo de árvore filogenética é dendrograma. Em filogenia chama-se dendrograma qualquer diagrama ramificado que conecta espécies (AMORIM, 2009). Atualmente também utiliza-se o termo “Árvores Filogenéticas” especificamente para os dendrogramas da Filogenia.

Para um melhor entendimento do trabalho, as estirpes foram divididas em três grupos ou clusters, com base na disposição dos ramos entre as árvores. O grupo 1 compreendeu as estirpes tipo *R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. mayense*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. hainaense*, *R. leucanae*, *R. callandrae*, *R. multihospitium*, *R. freirei*, *R. jaguaris*, *R. tropici*, *R. vallis* e *R. paranaense*, este grupo é conhecido por alguns autores como grupo Tropici (RIBEIRO et al., 2012). O grupo 2 foi constituído pelas espécies *R. etli*, *R. ecuadorensis*, *R. pisi*, *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. anhulense*, *R. laguerreae*, *R. pisi*, *R. sophorae*, *R. leguminosarum* trifoli, *R. phaseoli*, *R. indigoferae*, *R. sullae*, *R. gallicum*, *R. alamii* e *R. mesosinicum*. E o grupo 3 formado pela estirpe tipo *R. radiobacter*, *R. larrymoorei* e *R. pusense*. A espécie *Bradyrhizobium diazoefficiens* foi inserida na árvore como um grupo externo, com o propósito de se diferenciar das outras estirpes (Figura 2).

Na árvore filogenética da região parcial 16S do DNAr (Figura 2), se observa que cinco estirpes isoladas do tomate (6SL Fal., 15SL Fal., 36SL Fal., 39SL Con., 42SL Org.) e seis de lulo (9SQ Org., 16SQ Org., 26SQ Org., 40SQ Org., 42SQ Org. e 47SQ Org.) foram inseridas no grupo 1. Nota-se a formação de dois grandes ramos ou cladogramas, onde no primeiro grande ramo as estirpes estudadas 6SL Fal., 36SL Fal., 16SQ Org., e 47SQ Org. se posicionaram próximas das estirpes tipo *R. lusitanum*, *R. miluonense* e *R. mayense*, e os microrganismos 15SL Fal., 26SQ Org e 42SL Org. demonstraram maior proximidade pela espécie *R. rubi* (Figura 2). Os valores de identidade nucleotídica apresentados pelas estirpes *R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. mayense* e *R. rubi* variaram de 93,5% a 99,8%; 93,6% a 99,9%, 93,6% a 99,9% e de 93,4% a 99,6%, respectivamente (Tabela 4). Como estas estirpes tipo foram consideradas de maior proximidade, os maiores valores de identidade correspondem às estirpes estudadas. Os valores ultrapassaram o limite determinado pelos estudos realizados por Vandamme e colaboradores (1996), onde estirpes de espécies diferentes apresentaram menos de 97% de

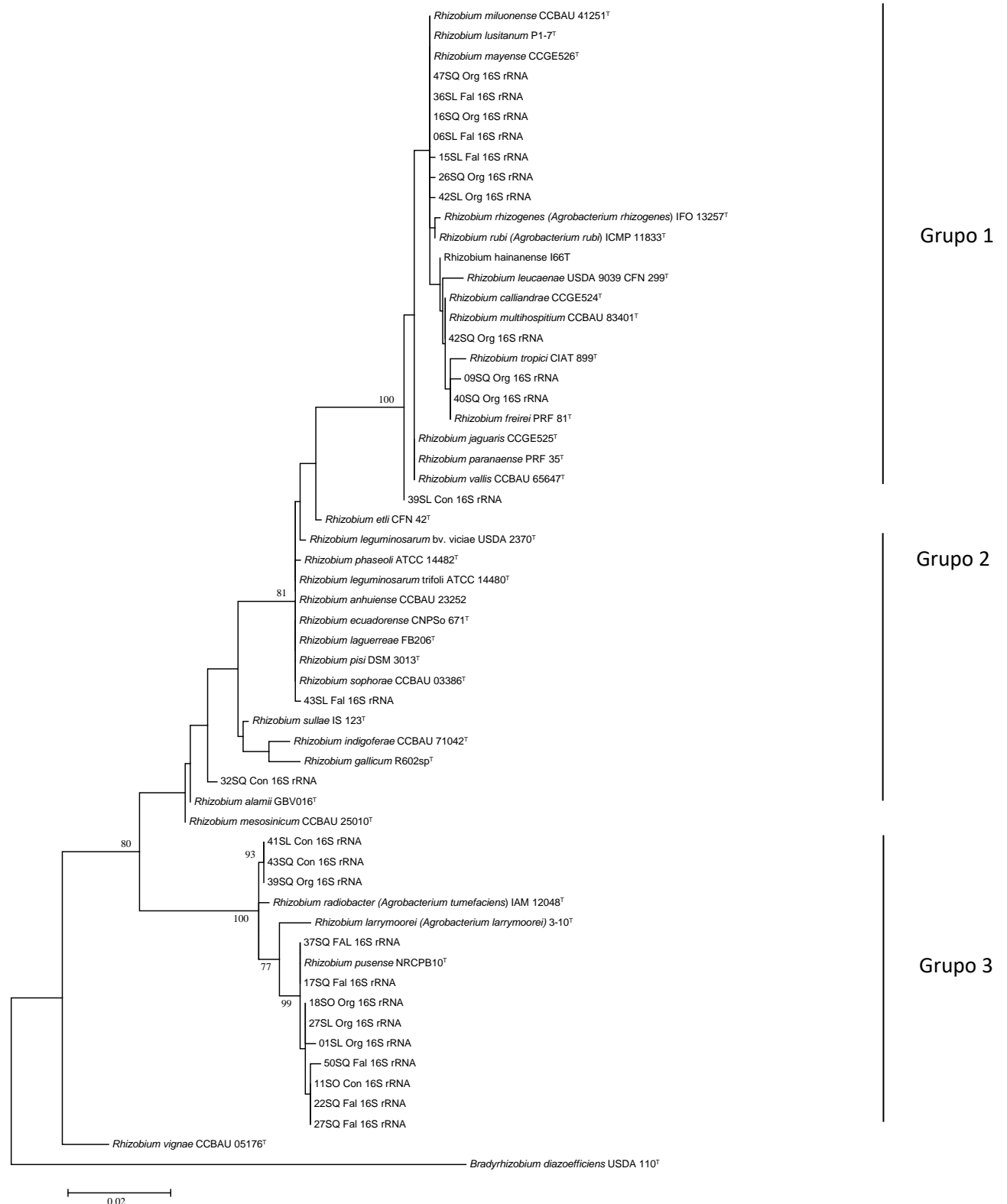
identidade nucleotídica em sequências do gene 16SrRNA, portanto, as estirpes estudadas do primeiro ramo do grupo 1 possuem chances de pertencerem a linhagem das espécies tipo de maior proximidade, necessitando de análises que complementem esta hipótese.

No segundo grande clado do grupo 1, a estirpe estudada 42SQ Org., demonstrou maior proximidade pelas estirpes tipo *R. multihospitium* e *R. calliandrae* e as amostras 40SQ Org. e 9SQ Org. se aproximaram mais das espécies *R. freirei* e *R. tropici*, respectivamente (Figura 2). A estirpe 39SL Con. posicionou-se em um ramo à parte, compartilhando de maior proximidade das espécies tipo *R. paranaense*, *R. jaguaris* e *R. vallis* (Figura 2). Os valores de identidade nucleotídica variam de: 93,5% a 99,8% para ambas as espécies *R. multihospitium* e *R. calliandrae*; de 93,5% a 99,9% para a estirpe *R. freirei*; de 92,8% a 99,2% para a espécie *R. tropici* e de 93,5% a 99,7% para as estirpes *R. paranaense*, *R. jaguaris* e *R. vallis* (Tabela 4). Os valores de identidade nucleotídica exibidos pelas estirpes tipo do segundo clado do grupo 1, indicam alta similaridade entre as estirpes do cluster que se originaram de um mesmo ancestral, indicado pelo nó correspondente ao ramo estudado. Com base nos estudos de Vandamme *et al.* (1996), as estirpes estudadas apresentam potencial de pertencerem as espécies consideradas mais próximas na árvore.

As espécies tipo do grupo 2, *R. anhuiense*, *R. laguerreae*, *R. sophorae*, *R. leguminosarum trifolii*, *R. ecuadorensis*, *R. pisi* e *R. phaseoli* foram agrupadas no mesmo ramo com estirpe estudada 43SL Fal. (Figura 2). A espécie *R. phaseoli* se colocou mais próxima da estirpe e exibiu um valor de identidade nucleotídica de 93,3% a 99,6% (Tabela 4), com base nestes valores a estirpe 43SL Fal. apresenta chance de pertencer a espécie *R. phaseoli*. A estirpe 32SQ Con. se posicionou em um ramo próprio com maior proximidade pela espécie *R. alamii* (Figura 2), que apresentou um valor de identidade de 94,7% a 99,3% (Tabela 4), indicando a possibilidade da estirpe 32SQ Con. representar um microrganismo da espécie *R. alamii*. Apesar do alto valor, o posicionamento assumido pela estirpe 32SQ Con. chamou atenção, pois se colocou mais isolada do restante do grupo 2 (Figura 2). A similaridade entre as estirpes tipo do grupo 2, já havia sido observada em estudos anteriores (RIBEIRO *et al.*, 2013).

O grupo 3 dividiu-se em dois clados principais que compreenderam a maioria das estirpes pesquisadas no trabalho (Figura 2). O primeiro grande ramo foi formado pelas estirpes estudadas 39SQ Org., 43SQ Con. e 41SL Con., e o segundo clado foi composto pelas estirpes 1SL Org., 27SL Org., 17SQ Fal., 37SQ Fal., 22SQ Fal., 27SQ Fal., 50SQ Fal., 18SO Org. e 11SO Con. (Figura 2). As estirpes estudadas do primeiro ramo do grupo 3 apresentaram proximidade pela espécie *R. radiobacter* que apresentou valores de identidade que variam de 94,4% a 99,3%. O segundo clado compreendeu a estirpe tipo *R. pusense*, considerada mais próxima das estirpes estudadas. A identidade nucleotídica da espécie *R. pusense* variou de 93,5% a 99,9% (Tabela 4), superando o limite de 97% de identidade (VANDAMME et al., 1996). Os valores demonstram a alta similaridade das estirpes do grupo 3, indicando a origem de um ancestral em comum, além disso, os resultados sugerem que as estirpes estudadas possam pertencer às espécies *R. radiobacter* e *R. pusense*, porém outras análises que corroborem com este resultado são necessárias.

O sequenciamento da região 16S DNAr é muito utilizada em estudos de diversidade bacteriana para uma definição em nível de gênero. A análise apenas do gene ribossomal torna difícil a discriminação de espécies estreitamente relacionadas, para uma melhor definição das estirpes estudadas é necessário a análise de sequências de regiões parciais dos genes *housekeeping* individuais e concatenados por meio da metodologia MLSA, muito utilizada para a definição de novas espécies do gênero *Rhizobium* (MARTENS et al., 2007; HUNGRIA et al., 2008).



Fonte: Autor

**Figura 2** - A árvore filogenética com 25 estirpes em estudo, baseadas apenas no gene 16S RNAr, construída por meio do programa MEGA 7 e analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo *Maximum Likelihood* com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foi utilizada como *outgroup*.

### 5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE REGIÕES PARCIAIS DOS GENES HOUSEKEEPING *glnII*, *recA* E *rpoA*

Assim como a árvore estudada do gene ribossomal, os dendogramas dos genes *housekeeping* foram gerados com base no agrupamento das estirpes em árvores contendo todas as espécies tipo de cada gene (Anexos B, C e D).

Para cada gene *housekeeping* foi construída uma árvore filogenética, onde foram utilizadas sequências que sofreram um corte no tamanho de 444 pb, 343 pb e 415 pb para os genes *glnII*, *recA* e *rpoA*, respectivamente. Os dendogramas estudados apresentaram um posicionamento das estirpes em 3 grupos, da mesma forma que a árvore de regiões parciais do gene 16S DNAr, porém com diferenças no número de espécies tipo e constituição dos grupos.

As estirpes 6SL Fal., 15SL Fal., 36SL Fal., 39SL Con., 42SL Org., 9SQ Org., 16SQ Org., 26SQ Org., 40SQ Org., 42SQ Org. e 47SQ Org. foram posicionadas no grupo 1, assim como na árvore do regiões parciais do gene 16S DNAr (Figura 2). As estirpes 16SQ Org., 26SQ Org., 42SL Org. e 47SQ Org. se posicionaram próximas em todas as árvores baseadas nos genes *housekeeping*. Nos dendogramas de regiões parciais dos genes *glnII* e *recA* (Figuras 3 e 4), a espécie tipo *R. tropici* se posicionou mais próxima das estirpes estudadas e na árvore do gene *rpoA* se observou maior proximidade do clado pela estirpe tipo *R. freirei* (Figura 5).

Os valores de identidade nucleotídica apresentados pela espécie *R. tropici* variaram de 86% a 98,1% na árvore baseada no gene *glnII* e de 85,3% a 96,1% para a árvore do gene *recA* (Tabela 4). A análise do gene *rpoA* revelou o valores de 89% a 99,2% de identidade da espécie *R. freirei* em relação as estirpes estudadas (Tabela 4). Os valores apresentados ultrapassaram o limite de 94% de identidade nucleotídica, valor referente ao estudo dos genes *housekeeping* individuais que delimitam a descrição de uma nova espécie proposto por Thompson et al. (2005). Desta forma, os resultados indicam que as estirpes estudadas 16SQ Org., 26SQ Org., 42SL Org. e 47SQ Org. pertencem as espécies *R. tropici* e *R. freirei*, além de alta similaridade que reflete em uma homologia entre os microrganismos . A análise das sequências

dos genes concatenados e outros testes genotípicos são necessários para se definir uma espécie com mais precisão.

As estirpes estudadas 6SL Fal., 15SL Fal. e 36SL Fal. do grupo 1, se posicionaram próximas em todas árvores. No dendograma gerado do gene *glnII*, as estirpes estudadas se posicionaram no mesmo ramo com maior proximidade pela espécie *R. tropici* (Figura 3). Na árvore do gene *recA*, as estirpes 6SL Fal. e 36SL Fal. se colocaram no mesmo ramo que a espécie *R. vignae* (Figura 4). Os microrganismos 6SL Fal. e 36SL Fal. da árvore do gene *rpoA*, formaram um clado a parte, próximo à espécie tipo *R. lusitanum*, a estirpe 15SL Fal. formou um ramo com o microrganismo 39SL Org, exibindo proximidade pela espécie tipo *R. multihospitium* (Figura 5). Na árvore do gene *glnII*, a estirpe 39SL Org. se colocou em um ramo isolado, mas próximo ao grande clado e com proximidade também pela espécie *R. tropici* (Figura 3). Observando a árvore baseada no gene *recA*, a estirpe 39SL Org. se posicionou mais distante do clado estudado e mais próximo da espécie *R. haianense* (Figura 4). As estirpes 6SL Fal., 36SL Fal. e 15SL Fal. apresentaram ainda altos valores de *bootstrap* nas árvores analisadas, indicando a alta confiabilidade estatística no posicionamento e formação dos ramos.

O valor de identidade nucleotídica da estirpe tipo *R. tropici* em relação as estirpes do estudo variaram de 86% a 98,1% na árvore do gene *glnII*. Os valores das estirpes do gene *recA* foram de 87,4% a 100% da espécie *R. vignae*, e de 87,7% a 98,2% da espécie *R. haianense* (Tabela 4). A análise do gene *rpoA* apresentou porcentagens de 88% a 97,2% para a estirpe *R. lusitanum* (Tabela 4) e de 88,3% a 98,7% para espécie tipo *R. multihospitium* (Tabela 4). As maiores porcentagens de identidade nucleotídica correspondem as estirpes estudadas posicionadas mais próximas nas árvores, logo os valores individuais das estirpes 6SL Fal., 15SL Fal., 36SL Fal. e 39SL Org. foram superiores ao limite de 94% para a descrição de uma nova espécie, baseada na análise de genes *housekeeping* individuais realizada por Thompson e colaboradores (2005). Os valores indicam alta similaridade das estirpes, logo, demonstram a homologia existente entre elas e a possibilidade destes microrganismos estudados pertencerem a linhagem das espécies *R. tropici* de acordo com a análise do gene *glnII*, *R. vignae* e *R. haianense*

referentes aos estudos do gene *recA*, e *R. lusitanum* e *R. multihospitium* conforme dados obtidos da árvore filogenética do gene *rpoA*.

As estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. se destacaram no trabalho devido ao posicionamento exibido entre os dendogramas gerados, onde foram inseridas em um ramo isolado das outras estirpes, caracterizando-se como um grupo monofilético. O ramo formado exibiu valores de *bootstrap* de 99% nas análises dos genes *glnII* e *recA* (Figura 3 e 4), demonstrando alta confiança estatística na formação dos ramos. Na árvore do gene *glnII*, a estirpe tipo *R. freire* se posicionou mais próxima das estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org (Figura 3). No gene *recA*, as estirpes estudadas se colocaram mais próximas apenas da estirpe tipo *R. hainaense* (Figura 4), e a análise do gene *rpoA* revelou maior proximidade pela espécie *R. freirei* (Figura 5). O valor de identidade nucleotídica da espécie *R. freire* em relação as estirpes da árvore do gene *glnII* variou de 88,2% a 96,3%. A estirpe tipo *R. hainaense* apresentou porcentagens de 87,7% a 98,2% de identidade na árvore do gene *recA* e a estirpe tipo *R. freirei* apresentou valores de 89% a 99,2% em relação as estirpes estudadas na análise do gene *rpoA*. Como os maiores valores foram superiores ao valor limite de 94% (THOMPSON et al., 2005), as estirpes estudadas 9SQ Org. e 40SQ Org. possuem alta similaridade com as estirpes tipo e grande potencial para pertencerem as espécies *R. freire* e *R. haiaense* de acordo com a análise dos genes *housekeeping*, apesar do posicionamento em ramos isolados característicos de microrganismos ainda não descritos.

A estirpe 42SQ Org. do grupo 1 demonstrou maior proximidade por diferentes estirpes tipo. As estirpes mais próximas foram *R. freire* no gene *glnII* (Figura 3), *R. hainanense* no gene *recA* (Figura 4) e *R. tropici* no gene *rpoA* (Figura 5). Os valores de identidade nucleotídica individuais das espécies tipo foram de 95,7%, 95% e de 98,5% para os genes *glnII*, *recA* e *rpoA*, respectivamente. Com base no posicionamento e nos valores individuais superiores a 94%, a estirpe estudada 42SQ Org. apresenta alta similaridade e homologia em relação às espécies tipo, com chance de pertencerem a alguma das espécies de maior proximidade citadas anteriormente, necessitando de análises complementares para uma definição.

O grupo 2 dos genes *housekeeping* apresentou uma constituição semelhante a árvore do gene 16S RNA. A estirpe estudada 32SQ

Con. se posicionou no mesmo ramo que a espécie *R. mesocinicum* ( Figura 3), que exibiu um valor individual de identidade nucleotídica de 94 %. Na árvore do gene *recA* (Figura 4), observou-se um posicionamento da estirpe 32SQ Con. no mesmo ramo que a espécie *R. alarii* que apresentou valores individuais de identidade de 88,8%. Assim como a análise anterior, o estudo do gene *rpoA* revelou o posicionamento da estirpe estudada no mesmo clado que a espécie *R. alarii* (Figura 5), com um valor de identidade nucleotídica individual de 96%. Com base nos resultados, a estirpe 32SQ Con. possui grande potencial para representar uma nova espécie, pois os valores de identidade nucleotídica permaneceram dentro do limite de 94% (THOMPSON et al., 2005), com exceção do gene *rpoA* que o ultrapassou em 2%, porém outros testes devem serem aplicados para se obter a confirmação de uma nova espécie.

Ainda no grupo 2, a estirpe 43SL Fal. se posicionou com maior proximidade de diferentes estirpes tipos. Nas árvores baseadas nos genes *glnII* e *recA*, a estirpe estudada se colocou no mesmo ramo que a estirpe tipo *R. vallis* (Figura 3 e 4). No dendograma do gene *rpoA*, a estirpe 43SL Fal. formou um ramo com a espécie *R. etli* (Figura 5). Os valores de identidade nucleotídica individuais foram de 95,2%; 92,9% e de 97%, para os genes *glnII*, *recA* e *rpoA*, respectivamente. Entre os resultados analisados, o valor apresentado no estudo do gene *recA*, chamou a atenção, por permanecer abaixo do limite de 94% de identidade nucleotídica (THOMPSON et al., 2005). Como a maioria dos valores foram superiores ao limite, a estirpe estudada 43SL Fal. pode pertencer as espécies *R. vallis* e *R. etli* baseado nas análises dos genes *glnII* e *rpoA*, respectivamente O valor apresentado pela estirpe *R. etli* do gene *rpoA* contrastou com os obtidos nos outros genes pois foi muito superior, necessitando de outras análises genotípicas e fenotípicas para uma confirmação de nova espécie.

Como na árvore do gene 16S, o grupo 3 compreendeu o maior número de estirpes estudadas e exibiu um elevado valor de *bootstrap*, indicando a alta confiabilidade no agrupamento das estirpes e formação dos ramos. Somente uma diferença foi observada entre os dendogramas, a estirpe tipo *R. haianense* foi inserida no grupo 3 na árvore gerada para o gene *rpoA* (Figura 5). Entre os microrganismos estudados do grupo, o ramo formado pelas estirpes 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Con, se destacou pelo posicionamento

no mesmo ramo em todas as árvores. As espécies tipo mais próximas foram as estirpes *R. radiobacter* e *R. haianense* na árvore dos gene *rpoA* (Figura 5) e somente a espécie *R. radiobacter*, nos dendogramas baseados nos genes *glnII* e *recA* (Figuras 3 e 4). Os valores individuais de identidade nucleotídica exibidos pela estirpe *R. radiobacter* em relação as estirpes 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Con, foram, respectivamente, 94,1%, 94,1% e 94,8%, na árvore com base no gene *glnII*. No gene *recA*, estes valores foram de 92,1% para a estirpe 41SL Con. e de 92,3% para as estirpe 39SQ Org. e 43SQ Con. A análise do gene *rpoA* apresentou os valores de identidade das estirpes tipo *R. radiobacter* e *R. haianense*, onde ambos foram de 97,7% para a estirpe 41SL Con. e de 98% para as estirpes 39SQ Org. e 43SQ Com. Apesar da alta similaridade apresentada na árvore do gene *rpoA*, as estirpes 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Com. demonstraram potencial para representar uma nova espécie de rizóbio, devido ao posicionamento das estirpes em um ramo à parte e os baixos valores de identidade observados na análise dos genes *glnII* e *recA*. Outros ensaios, porém são necessárias para se obter uma descrição mais completa das estirpes.

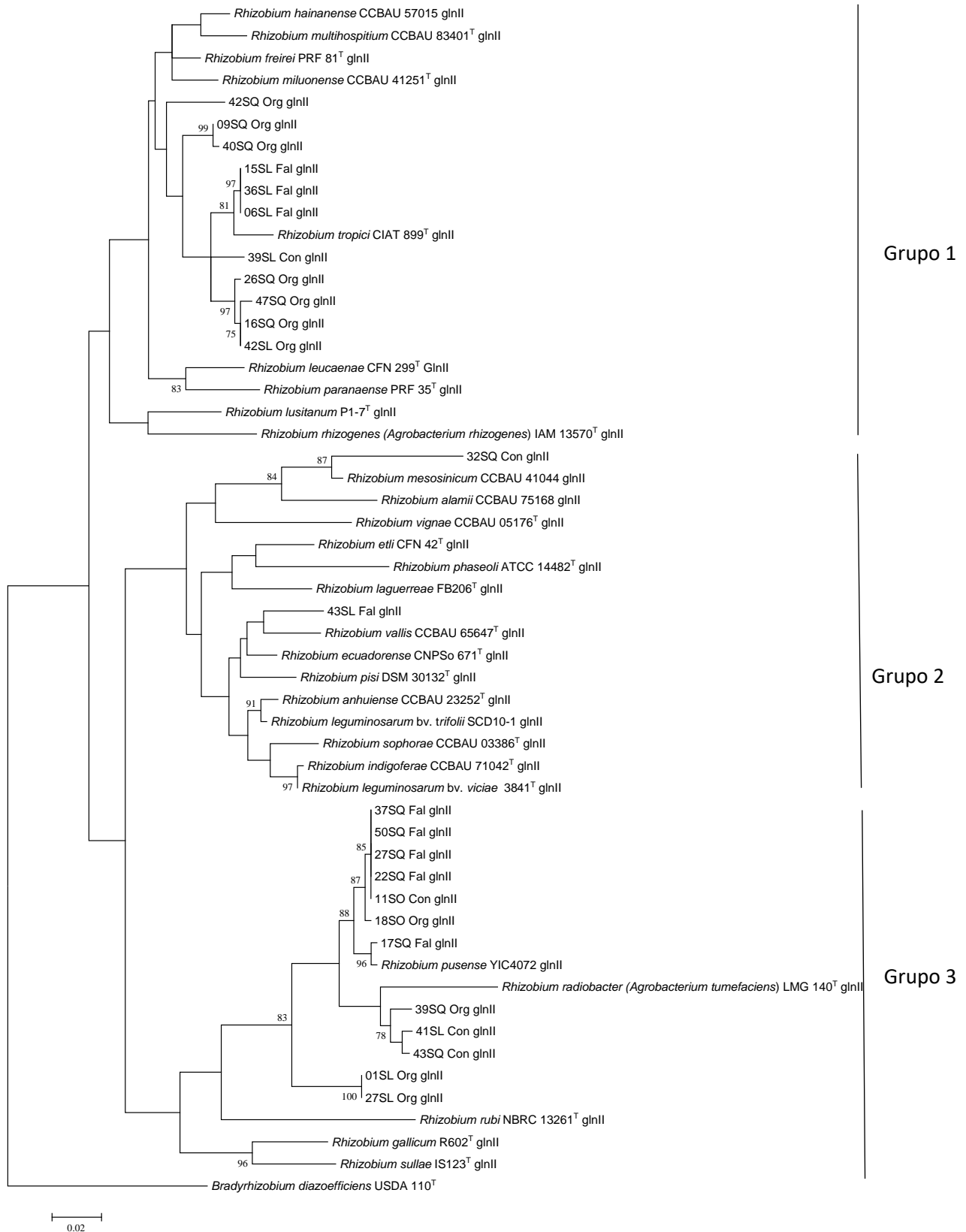
As estirpes 1SL Org. e 27SL Org. foram posicionadas no mesmo ramo e demonstraram proximidade pela espécie tipo *R. pusense* em todas as árvores dos genes *housekeeping* (Figuras 3, 4 e 5). Os valores de identidade nucleotídica individuais da estirpe tipo *R. pusense* foram de 94,1% para ambas as estirpes estudadas na árvore do gene *glnII*. No gene *rpoA*, a espécie tipo exibiu valores individuais de 98% para a estirpe 1SL Org. e de 99% para a amostra 27SL Org. Na análise no gene *recA*, os valores foram de 93,8% para as duas estirpes estudadas. Apesar dos altos valores de identidade exibidos pela análise do gene *rpoA*, as estirpes 1SL Org. e 27SL Org. podem representar uma nova espécie de rizóbio com base posicionamento isolado do ramo e nos valores de identidade próximos a 94% (THOMPSON et al., 2005), encontrados no estudo dos genes *glnII* e *recA*.

As estirpes 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQFal., 50SQ Fal., 11SO Con. e 18SO Org. se posicionaram nos mesmos ramos ou em ramos adjacentes, mantendo a proximidade em todas as árvores dos genes *housekeeping*. Próximo ao clado citado, a estirpe 17SQ Fal. e a espécie tipo *R. pusense* se posicionaram no mesmo ramo, presente também em todas as

árvores analisadas. Todas estas estirpes estudadas apresentaram maior proximidade pela espécie tipo *R. pusense*. Os valores individuais de identidade nucleotídica do gene *glnII* foram de 98,4% para as estirpes 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQFal., 50SQ Fal., 11SO Con. e 18SO Org. e de 99,5% para o microrganismo mais próximo 17SQ Fal. As análises dos genes *recA* e *rpoA* revelaram valores individuais que variaram de 96,1% a 99,7% e de 98,5% a 99,7%, respectivamente. Os altos valores de identidade indicam que as estirpes 17SQ Fal., 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQFal., 50SQ Fal., 11SO Con. e 18SO Org. pertencem a alguma linhagem da espécie *R. pusense*. Como nos demais estudos deste trabalho, outras análises, como o MLSA, são necessários para uma descrição mais precisa.

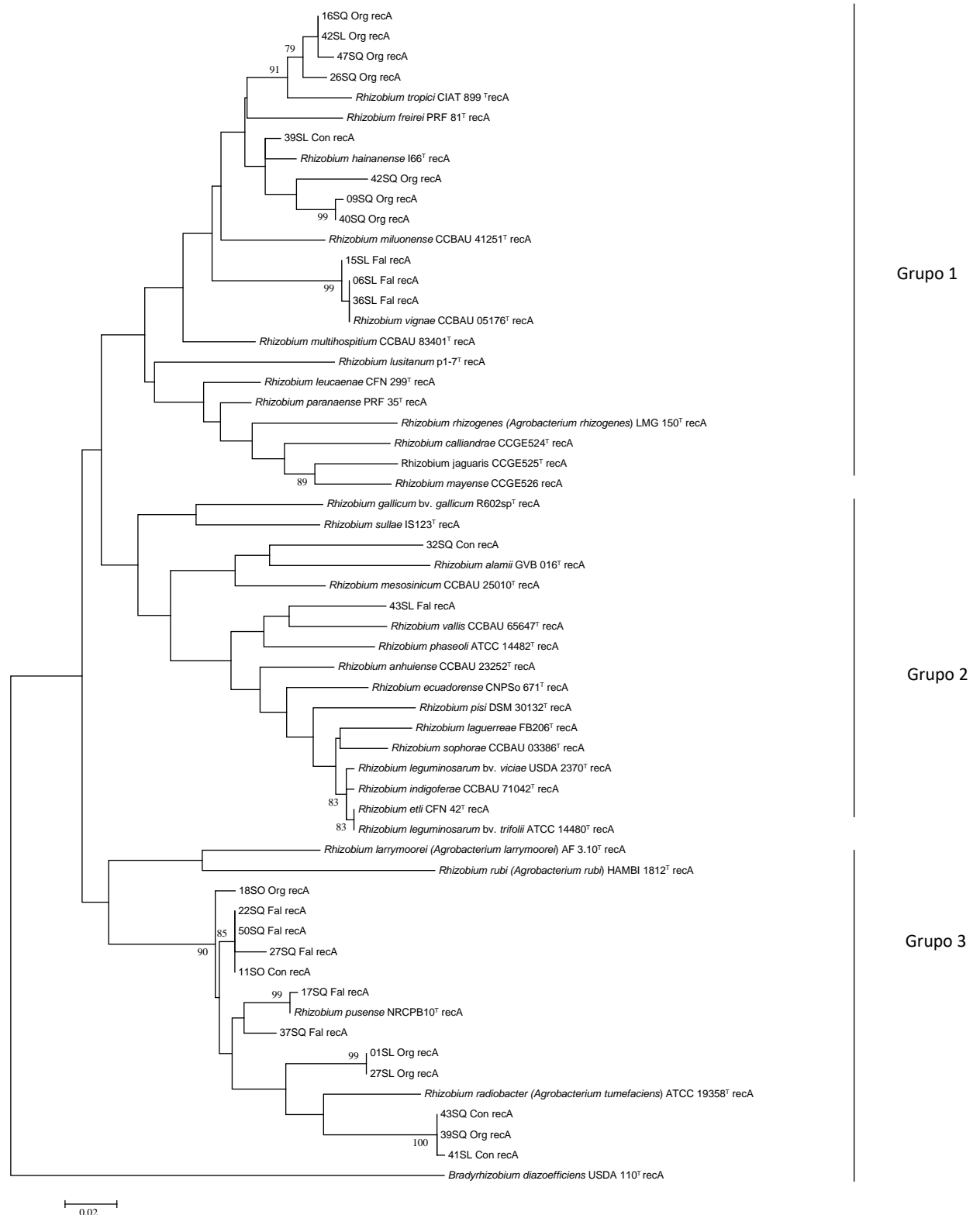
As porcentagens dos sítios conservados, variáveis e de parcimônia informativa dos genes estudados foram mostradas na Tabela 5. A parcimônia informativa dos genes *housekeeping* superaram os valores exibidos pelo gene 16S rRNA, atrelando à isso, uma melhor resolução da árvore filogenética baseada no gene ribossomal. Os valores de parcimônia foram de 8,2% (71 pb) para o gene 16S rRNA; 27,7% (110 pb) para o gene *glnII*; 32% (111 pb) para o gene *recA*; 23,1% (79 pb) para o gene *rpoA* e 26,2% (300 pb) para a análise concatenada (Tabela 5). Entre os genes *housekeeping*, o maior valor de parcimônia foi exibido pelo gene *recA*, enquanto que a menor porcentagem foi apresentada pelo gene *rpoA*.

Com base na análise dos genes *housekeeping* individuais foi possível observar uma alta similaridade entre algumas estirpes do grupo 1 e 3, pois apresentaram os maiores valores de similaridade nucleotídica do estudo. As estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. do grupo 1 se destacaram pelo posicionamento nas árvores, porém apresentaram altos valores de identidade. A estirpe 32SQ Con. e os microrganismos estudados 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Con do cluster 3, representam um grupo com chance de compreender uma nova espécie de rizóbio, pois exibiram valores de identidade dentro do limite de descrição. Para se obter mais dados referentes as relações filogenéticas dos microrganismo estudados, a análise das sequências dos genes *housekeeping* concatenados, a partir da metodologia MLSA foi realizada.



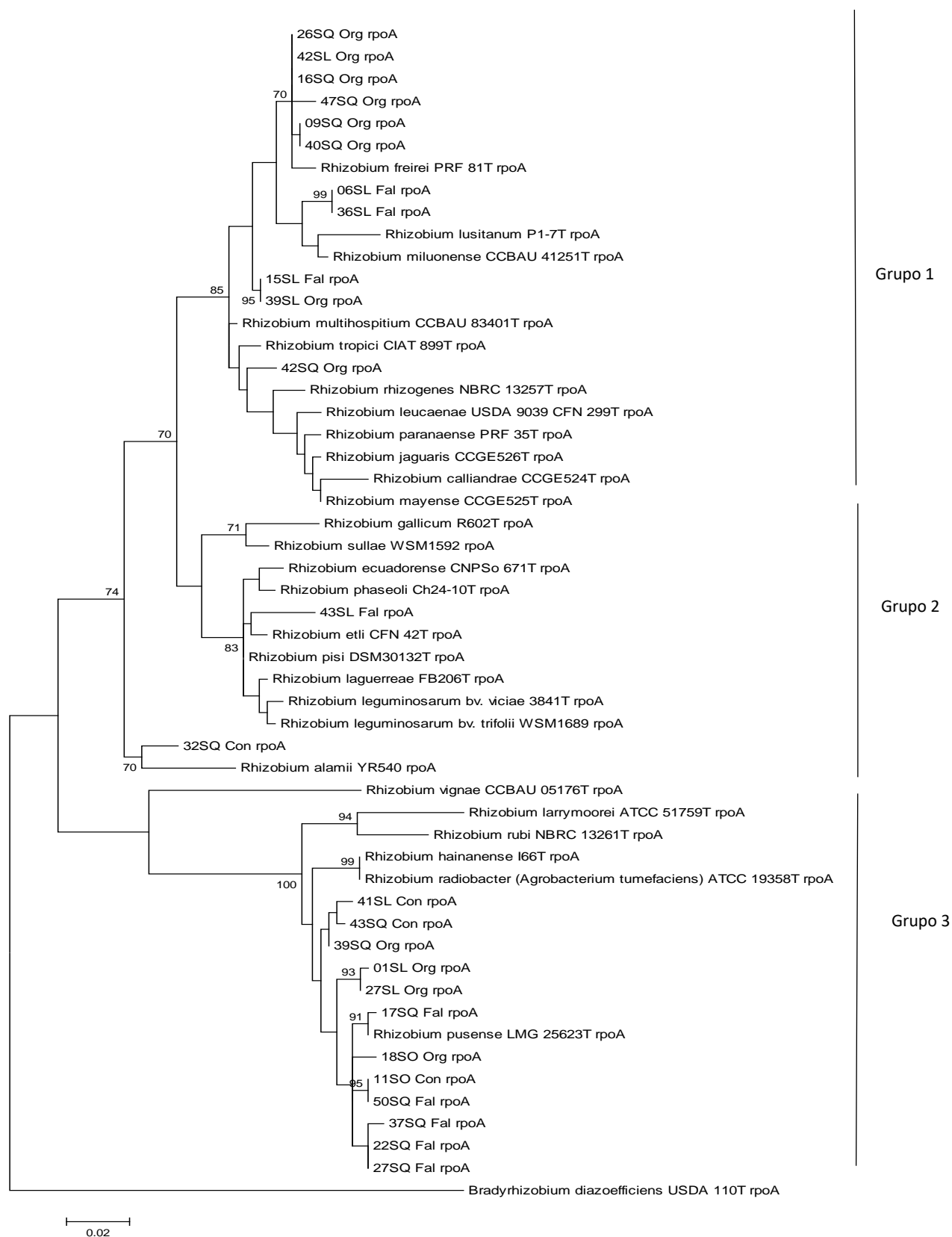
Fonte: Autor

**Figura 3** - A árvore filogenética das 25 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *glnII* foi construída por meio do programa MEGA 7, analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo Maximum Likelihood, com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foi utilizada como *outgroup*.



Fonte: Autor

**Figura 4** - A árvore filogenética das 25 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *recA* foi construída por meio do programa MEGA 7, analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo Maximum Likelihood, com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foi utilizada como *outgroup*.



Fonte: Autor

**Figura 5** - A árvore filogenética das 25 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *rpoA* foi construída por meio do programa MEGA 7, analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo Maximum Likelihood, com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foi utilizada como *outgroup*.

#### 5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MLSA

Na análise por MLSA, as sequências dos genes *housekeeping glnII*, *recA* e *rpoA* foram concatenadas, alinhadas e cortadas a um tamanho de 1224 pb. O estudo de diversidade por MLSA revelou um posicionamento distinto dos grupos em relação às outras árvores geradas neste trabalho, entretanto, a constituição permaneceu a mesma (Figura 6).

Assim como nas árvores anteriores, o grupo 1 exibiu um ramo agrupando as estirpes 16SQ Org., 26SQ Org., 47SQ Org. e 42SL Org., posicionadas próximas a estirpe tipo *R. tropici* (Figura 6), que expressou valores de identidade nucleotídica individuais de 96,8%, 96,8%, 96,2% e de 96,8% para estirpes 16SQ Org., 26SQ Org., 47SQ Org. e 42SL Org., respectivamente. O ramo exibiu o valor de 99% de *bootstrap* indicando a alta confiança no agrupamento das estirpes que o formam (Figura 6). Embora o posicionamento adotado pelas estirpes em um ramo separado possa ser um indicativo de nova uma nova espécie (Figura 6), os valores de identidade nucleotídica foram considerados altos. Com base nos estudos de Konstandinis, Ramette e Tiedje (2006), onde verificaram que espécies diferentes apresentaram menos de 96% de identidade nucleotídica na análise concatenada dos genes *housekeeping*, as estirpes 16SQ Org., 26SQ Org., 47SQ Org. e 42SL Org., provavelmente pertencem a uma espécie descrita, mais especificamente a alguma linhagem da espécie *R. tropici*. Além do posicionamento e alta similaridade, a espécie *R. tropici* é muito presente nos solos ácidos brasileiros, isolada pela primeira vez em feijão (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), cultura muito empregada em rotação com o milho, explicando a presença das estirpes estudadas no solos orgânicos que possuem um histórico de cultivo de milho. A espécie *R. tropici* apresenta ainda, um plasmídeo de uma única cópia do gene *nifH*, que confere uma ampla gama de hospedeiros ao microrganismo (AMARGER *et al.*, 1994).

Os resultados do primeiro ramo são compatíveis com os encontrados no estudo das sequências individuais, onde foi observada alta similaridade entre as estirpes e homologia, sustentando as informações obtidas pela análise por MLSA. A inclusão de outras análises fenotípicas e genotípicas

é necessária para uma melhor definição das espécies do primeiro ramo analisado.

As estirpes 6SL Fal., 15SL Fal. e 36SL Fal. foram inseridas próximas à espécie *R. tropici* e os valores individuais de identidade nucleotídica foram de 95,9%; 96,3% e 95,9% para as estirpes 6SL Fal., 15SL Fal., e 36SL Fal., respectivamente. Analisando os valores citados, as estirpes 6SL Fal. e 36SL Fal. podem representar possíveis espécies ainda não descritas baseadas nos parâmetros deste trabalho, pois apresentaram percentuais inferiores ao limite de 96% (Konstandinis *et al.*, 2006), além de um posicionamento característico de novas espécies. A estirpe 15SL Fal. pode também representar uma nova espécie pelo valor considerado dentro do limite, pois o ultrapassou em apenas 0,3%. Os valores de identidade nucleotídica das sequências dos genes individuais foram superiores ao limiar estabelecido, contrastando com o encontrado no estudo concatenado das estirpes 6SL Fal., 15SL Fal. e 36SL Fal., havendo a necessidade de outras análises para se chegar a uma confirmação.

A estirpe 39SL Con. se colocou em ramo isolado, apresentando maior proximidade pela espécie *R. tropici*. O valor de identidade da espécie tipo em relação à estirpe estudada foi de 96,8%, ultrapassando o limite de 96% (Konstandinis *et al.*, 2006), resultado obtido na análise individual. Com isso, pode-se sugerir que a estirpe 39SL Con. pertence a espécie *R. tropici*.

As estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. do grupo 1 se destacaram pelo posicionamento isolado em um mesmo ramo em todos os dendogramas, um indicativo para novas espécies. O ramo formado pelas estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. exibiu um valor de 100% de *bootstrap*, demonstrando alta confiabilidade estatística no agrupamento destas estirpes (Figura 6). Próximo ao ramo analisado, a amostra 42SQ Org. se colocou em um clado à parte (Figura 6). Todas estas estirpes pesquisadas apresentaram maior proximidade pela espécie *R. freire*, inclusive a estirpe 42SQ Org. (Figura 6). Os valores de identidade nucleotídica individuais da espécie *R. freire* foram de 95,9% para as estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. e de 95,1% para a estirpe 42SQ Org. Todos os valores permaneceram dentro do limite de 96% (Konstandinis *et al.*, 2006),

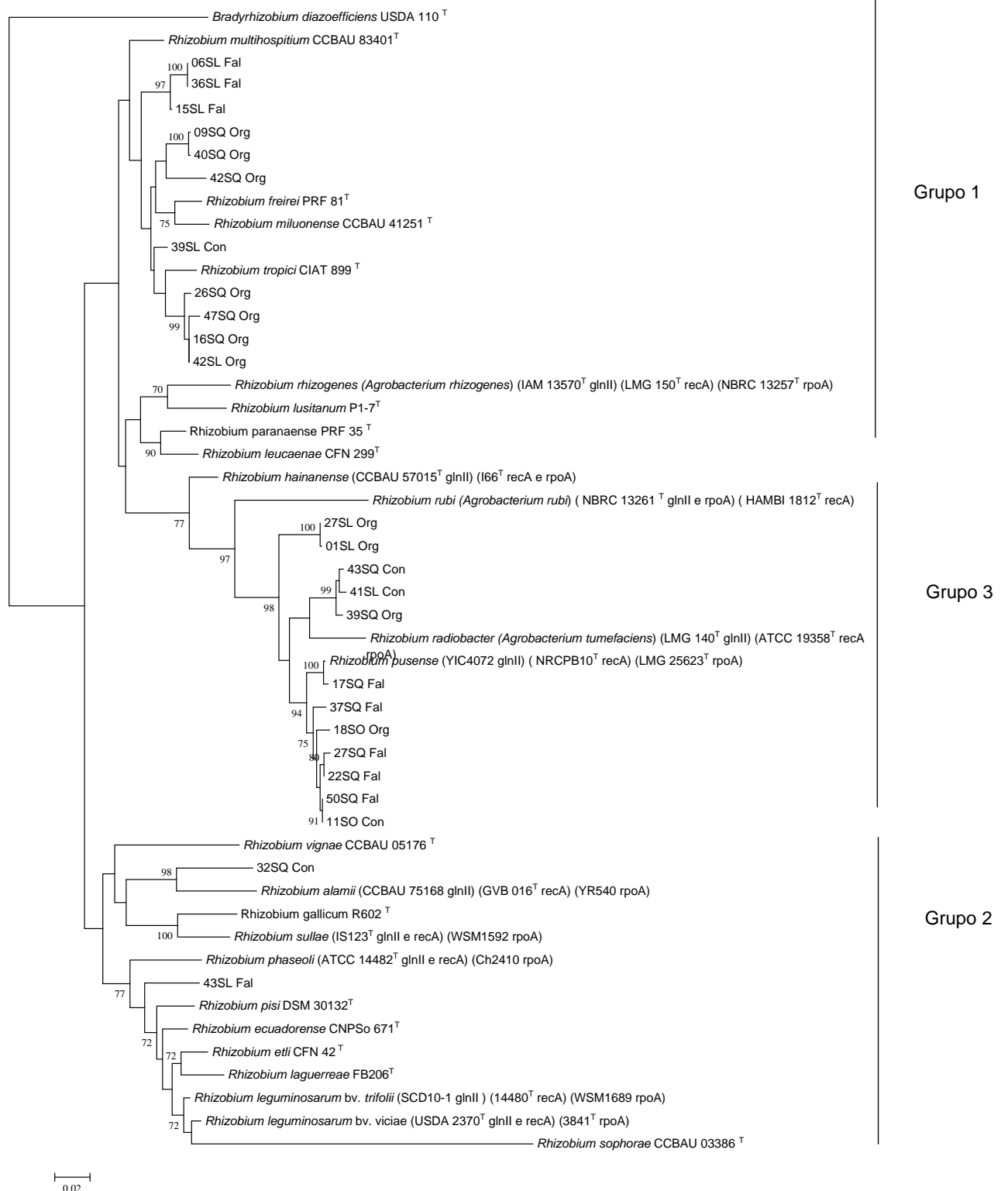
demonstrando que as estirpes 9SQ Org., 40SQ Org. e 42SQ Org. podem representar uma nova espécie do gênero *Rhizobium*.

O grupo 2 apresentou uma composição semelhante às outras árvores analisadas. A estirpe 32SQ Con., inserida no grupo 2, revelou maior proximidade pela espécie tipo *R. alamii* (Figura 6), que expôs um valor de identidade nucleotídica de 91,7% para a estirpe estudada. De acordo com Konstandinis e colaboradores (2006), o valor apresentado pela espécie *R. alamii* sugere que a amostra 32SQ Con. representa uma nova espécie de microrganismo, hipótese reforçada pelos resultados obtidos na análise individual dos genes. A estirpe estudada 43SL Fal. do grupo 2, se colocou mais próxima da espécie *R. pisi* (Figura 6), que exibiu um valor de identidade nucleotídica de 94,7%, abaixo do limite de 96% (KONSTANDINIS et al., 2006), caracterizando a estirpe 43SL Fal., como outra possível nova espécie. Este resultado diverge da análise individual dos genes, onde os valores demonstraram alta similaridade entre as estirpes, necessitando de estudos que complementem a descrição da amostra 43SL Fal. A hipótese das estirpes estudadas do grupo 2 pertencerem a linhagem da espécie *R. phaseoli* não está descartada, pelo fato deste microrganismo ser reportado em solos sul-americanos (HERRERA-CERVERA et al., 1999), e a possibilidade de ter se adaptado ao estresse causado pelas condições do solo, pois esta estirpe não tolera meios com o pH ácido (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Esta suposição, se confirmada, pode ser aproveitada, uma vez que a espécie *R. phaseoli* foi empregada em estudos de promoção de crescimento em plantas não-leguminosas, como o tomate (GARCÍA-FRAILE et al., 2012), assim como, a estirpe 32SQ Con. em pertencer a linhagem da espécie *R. alamii*, microrganismo encontrado na rizosfera de girassóis (BERGE et al., 2009).

No grupo 3, a estirpe tipo *R. radiobacter* (Figura 6), considerada mais próxima das estirpes 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Con., expressou, respectivamente, uma identidade nucleotídica de 94,7%, 94,9% e 95,2%. Os resultados obtidos foram similares aos observados nos dendogramas anteriores, onde as estirpes estudadas se posicionaram em um ramo a parte e exibiram valores de identidade nucleotídica inferiores ao limite de descrição, demonstrando o potencial das 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ Con. em representarem novas espécies.

O clado constituído pelas amostras 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQ Fal., 50SQ Fal., 11SO Con. e 18SO Org. do grupo 3 (Figura 6), se colocaram próximos a espécie *R. pusense*, onde os valores de identidade para estas estirpes foram de 98,3%, 97,9%; 98%; 98,3%; 98,3% e 97,9%, respectivamente. Todos os valores citados permaneceram superiores ao limite de descrição de espécies (KONSTANDINIS et al., 2006), como nas análises anteriores, portanto, as estirpes 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQ Fal., 50SQ Fal., 11SO Con. e 18SO Org. constituem um grupo com potencial pertencerem a linhagem da espécie *R. pusense*. A estirpe 17SQ Fal. formou um ramo com a espécie *R. pusense*, observado nas árvores anteriores. A espécie tipo exibiu um valor de identidade de 99,6%, isto demonstra o potencial da estirpe 17SQ Fal. em pertencer a alguma linhagem da espécie *R. pusense*, assim como as estirpes do estudo citadas anteriormente.

As estirpes 1SL Org. e 27SL Org. se agruparam no mesmo ramo no grupo 3 (Figura 6), disposição semelhante encontrada nas árvores anteriores. O valor de 100% de *bootstrap* indica a alta confiança no estabelecimento do ramo (Figura 6), ou seja, em 1000 comparações das sequências (*bootstrap* 1000), todas posicionaram as estirpes estudadas no mesmo ramo. A espécie *R. pusense*, considera mais próxima, exibiu uma identidade nucleotídica de 95,3% e 97,9% para as estirpes 1SL Org. e 27SL Org., respectivamente. O valor referente à estirpe 1 SL Org. permaneceu inferiores ao limite de 96%, indicando uma possível nova espécie, o mesmo observado nas análises anteriores. Mas o valor apresentado para estirpe 27SL Org. foi superior, um indicativo de pertencer a uma espécie *R. pusense*, apesar da organização das estirpes em um ramo isolado, contrastando com os outros resultados. Isso mostra a necessidade de testes complementares para se obter uma definição correta sobre as estirpes 1SL Org. e 27SL Org.



Fonte: Autor

**Figura 6** - A árvore filogenética das 25 estirpes em estudo baseadas na análise por MLSA foi construída por meio do programa MEGA 7, analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo Maximum Likelihood, com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foi utilizada como *outgroup*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das sequências dos genes *housekeeping* permitiu uma discriminação mais eficaz e precisa das estirpes que somente a análise de regiões parciais do gene 16S DNAr. Desta maneira, as expectativas do trabalho foram correspondidas em relação à metodologia MLSA, principal ferramenta para a classificação de novas espécies de rizóbios.

Os resultados obtidos se mostraram muito análogos, apresentando alta diversidade intraespecífica, um padrão na ramificação e valores de identidade nucleotídica sem discrepância. O posicionamento das estirpes nas árvores exibiu uma relação entre os microrganismos estudados e as plantas hospedeiras onde foram isolados com seus respectivos solos. As estirpes isoladas de tomate cultivado em solo de mata, se agruparam no mesmo clado no grupo 1, assim como estirpes obtidas do lulo cultivado em solo de manejo orgânico. No grupo 3, as estirpes isoladas de tomate cultivado em solo orgânico, de lulo em solo de mata e do solo, se agruparam em seus respectivos cladogramas, ou próximos, seguindo a relação observada. Este posicionamento pode ser devido as características das estirpes, como foram isoladas da mesma planta hospedeira e do mesmo tipo de solo, estas estirpes possuem muitas semelhanças, com chance de pertencerem à mesma espécie. É possível notar também, a capacidade de adaptação das estirpes do gênero *Rhizobium*, observada pela colonização das plantas hospedeiras tomate e lulo, do tipo não-leguminosas.

No grupo 1, as estirpes 16SQ Org., 26SQ Org., 47SQ Org. e 42SL Org., agrupadas no mesmo ramo, apresentaram alta similaridade e homologia, indicando uma descendência em comum com chances de pertencerem as linhagens das espécies tipo de maior proximidade de acordo com a análise do gene 16S RNAr, representarem um microrganismo da espécie *R. tropici* baseado nos estudos dos genes individuais (*glnII* e *recA*) e MLSA, e constituir uma estirpe da espécie *R. freire* de acordo com o gene *rpoA*.

Os microrganismos 6SL Fal., 15SL Fal., 36SL Fal. e 39SL Con., todos isolados do tomate, apresentaram valores superiores ao limite indicando a possibilidade de pertencerem as espécies de maior proximidade

na análise do gene 16S RNAr. Na análise do gene *glnII*, as estirpes 6SL Fal., 15SL Fal., 36SL Fal. e 39SL Con. demonstraram pertencerem a espécie *R. tropici*. Na árvore do gene *recA*, as estirpes 6SL Fal., 15SL Fal. e 36SL Fal. apresentaram possibilidades de representarem microrganismos da espécie *R. vignae* e a estirpe 39SL Org. em constituir a espécie *R. haianense*. No estudo do gene *rpoA*, as estirpes 6SL Fal. e 36SL Fal. se colocaram como linhagens da espécie *R. lusitanum* e os microrganismos 15SL Fal. e 39SL Org. pertencentes a espécie *R. multihospitium*. Na pesquisa por MLSA, as amostras 6SL Fal., 15SL Fal. e 36SL Fal. apresentaram potencial em representar uma nova espécie baseado nos parâmetros utilizados neste trabalho, porém a estirpe 39SL Con. demonstrou integrar a espécie *R. tropici*.

As estirpes 9SQ Org. e 40SQ Org. demonstraram pertencerem as espécies *R. tropici* e *R. freire*, respectivamente, de acordo com a análise do gene 16S RNAr. Na árvore do gene *glnII* e *rpoA*, as estirpes estudadas foram incluídas na espécie *R. freire* e a análise do gene *recA* as estirpes foram inseridas como microrganismos da espécie *R. haianense*. A estirpe 42SQ Org. demonstrou pertecer as espécies *R. multihospitium* e *R. calliandrae* com base na análise do gene 16S RNAr. O estudo dos genes housekeeping individuais classificou a estirpe 42SQ Org. como pertencente as espécies *R. freire*, *R. haianaense* e *R. tropici* nos genes *glnII*, *recA* e *rpoA*, respectivamente. Os valores de identidade nucleotídica divergiram quanto ao resultado final, onde na análise por MLSA as estirpes 9SQ Org., 40SQ Org. e 42SQ Org. apresentaram chances de representarem uma nova espécie. Estes resultados mostram a necessidade de outras análises fenotípicas e genotípicas que corroborem com a descrição correta das estirpes.

No grupo 2, a estirpe 32SQ Con. demonstrou ser candidata a uma nova espécie pelo posicionamento em um ramo à parte do grupo e por exibir valores de identidade nucleotídica abaixo do limite estipulado em todas as árvores com exceção do dendograma do gene 16S RNAr, onde a estirpe 32SQ Con. se colocou com um microrganismo da espécie *R. alarii*. A estirpe 43SL Fal. apresentou baixos valores de identidade na análise por MLSA e assim grandes chance de representar uma nova espécie, porém o estudo individual dos genes revelou a possibilidade da estirpe estudada em pertencer a espécie *R. phaseoli* com base no estudo do gene 16S RNAr. A análise dos

genes *glnII* e *recA* incluíram a estirpe estudada na linhagem da espécie *R. vallis*. A análise do gene *rpoA* revelou a possibilidade da estirpe 43SL Fal. em representar um microrganismo da espécie *R. freire*. Este resultado demonstra a necessidade de mais ensaios para uma definição correta sobre as estirpes 43SL Fal., e 32SQ Con.

No grupo 3, as estirpes 1SL Org., 27SL Org. 41SL Con., 39SQ Org. e 43SQ demonstraram potencial de representar um nova espécie de acordo com os parâmetros utilizados neste trabalho, tanto na análise individual quanto concatenada dos genes *housekeeping*, apenas o estudo do gene ribossomal indicou a possibilidade destas estirpes em pertencerem a espécie *R. radiobacter*, com exceção das estirpes 1SL Org. e 27SL Org que se posicionaram em ramos disintos nas outras árvores. As estirpes 22SQ Fal., 27SQ Fal., 37SQ Fal., 50SQ Fal., 11SO Con., 18SO Org. e 17SQ Fal. exibiram valores de identidade nucleotídica superiores ao limite estabelecido em todas as análises, demonstrando a capacidade destas estirpes em representar microrganismos da espécie *R. pusense*, porém, estudos complementares são necessários para uma melhor definição.

As análises necessárias para uma completa descrição de espécie são os testes fenotípicos como a forma bacteriana, presença/ausência de flagelos, corpos de inclusão, coloração de Gram, crescimento microbiano em diferentes condições como: valores de pHs, temperaturas, concentrações de sais, diferentes fontes de carbono, presença de antibióticos e análises quimiotaxonômicas. Além disso, testes genotípicos e filogenéticos são necessários como hibridação DNA-DNA ou ANI (*Average Nucleotide Identify*), perfil de ácidos graxos e conteúdo de bases nucleotídicas de DNA (% G + C). Como sugestões para estudos posteriores estão, a análise do gene *nif* envolvido na fixação de N; a substituição do gene *rpoA* pelo gene *gyrB*, que pode contribuir com aumento do número de estirpes tipo na árvore; testes de inoculação com as estirpes estudadas, especialmente as amostras 32SQ Con. e 43SL Fal. que demonstraram similaridade com as espécies *R. alamii* e *R. phaseoli*, microrganismos empregado em estudos com plantas não-leguminosas como girassol e tomate, respectivamente.

O estudo filogenético, portanto, analisou a diversidade de espécies do gênero *Rhizobium* isolados de plantas não-leguminosas, no que

tange a bioprospecção de microrganismos e selecionou estirpes em potencial para serem submetidas a testes complementares e assim serem confirmadas como novas espécies. A partir disso, estudos que visam à elaboração de produtos comerciais destinados a cultura de plantas não-leguminosas, com o objetivo de promover um maior rendimento e menor impacto ambiental, podem ser conduzidos, resultando em melhor qualidade de vida dos produtores e consumidores.

Tabela 3 – Números de acesso das estirpes tipo utilizadas no trabalho.

Estirpe	16S	glnII	recA	rpoA
<i>Rhizobium alamii</i> GBV016 <sup>T</sup> (CCBAU 75168) (YR540)	AM931436.1	KM373719.1	GU552971.1	NZ_JQMB010000 11.1*
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252	KF111868.2	JQ585847.1	JQ585891.1	X
<i>Rhizobium calliandrae</i> CCGE524 <sup>T</sup>	JX855162.1	X	JX855189.1	KF761517.1
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSo 671 <sup>T</sup>	JN129381.1	JN129306.1	JN129351.1	JN129366.1
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	U28916.1	EU488776.1	EU488824.1	EU488844.1
<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	EU488742.2	EU488789.1	EU488827.1	EU488836.1
<i>Rhizobium gallicum</i> R602 <sup>T</sup> (R-4387)	U86343.1	EU488785.1	AM182124.1	EU488840.1
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU 57015 (I66)	U71078.2	GU726294.1	HQ394252.1	KF738132.1
<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU 71042 <sup>T</sup>	AF364068.1	JN580717.1	EF027965.1	X
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525 <sup>T</sup> (CCGE526)	JX855169.1	X	JX855192.1	KF761519.1
<i>Rhizobium larrymoorei</i> 3-10 <sup>T</sup> (ATCC 51759)	Z30542.1	X	FN432355.1	NZ_KI912457.1*
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	JN558651.2	JN558671.1	JN558681.2	MRDM01000007. 1*
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (3841)	U29386.1	AM236080.1*	AM236080.1*	AM236080.1*
<i>Rhizobium leguminosarum trifoli</i> ATCC 14480 <sup>T</sup> (SCD10-1) (WSM1689)	AY509900.1	KF749082.1	EF113135.1	CP007045.1*
<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299 <sup>T</sup>	EU488741.1	EU488777.1	EU488817.1	EU488845.1
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 <sup>T</sup>	AY738130.2	EF639841.1	DQ431674.1	JF318205.1
<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526 <sup>T</sup> (CCGE525)	JX855172.1	X	JX855195.1	KF761518.1
<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 <sup>T</sup> (CCBAU 41044)	DQ100063.1	DQ310809.1	EU120732.1	X
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	EF061096.1	HM047120.1	HM047131.1	JF318206.1
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 <sup>T</sup>	EF035074.2	EF490040.1	EF490029.1	JF318207.1
<i>Rhizobium paranaense</i> PRF 35 <sup>T</sup>	EU488753.1	EU488787.1	EU488826.1	EU488842.1
<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482 <sup>T</sup> (Ch24-10)	EF141340.1	JN580716.1	EF113136.1	AHJU02000001.1 *
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 <sup>T</sup>	AY509899.1	JN580715.1	DQ431676.1	KC293535.1
<i>Rhizobium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup> (YIC4072) (LMG 25623)	FJ969841.2	KR154018.1	HQ166059.1	FNBB01000002.1 *
<i>Rhizobium radiobacter</i> LMG 140 <sup>T</sup> (ATCC 19358 <sup>T</sup> )	NR_041396.1*	JN580718.1	FM164311.1	KC293536.1
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 <sup>T</sup> (IAM 13570) (LMG 150) (NBRC 13257)	AY945955.1	FJ816281.1	AM182126.1	BAYX01000002.1 *
<i>Rhizobium rubi</i> CMP 11833 <sup>T</sup> (NBRC 13261) (HAMBI 1812)	AY626395.1	BBJU0100000 3.1	KF206814.1	BBJU01000015.1 *
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup>	KJ831229.2	KJ831241.1	KJ831252.1	MRDK01000003. 1*
<i>Rhizobium sullae</i> IS 123 <sup>T</sup> (WSM1592)	Y10170.1	FJ816280.1	FJ816279.1	NZ_ATZB010000 06.1*
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <sup>T</sup>	EU488752.1	EU488791.1	EU488815.1	EU488833.1
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647 <sup>T</sup>	FJ839677.1	GU211771.1	GU211770.1	x
<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU 05176 <sup>T</sup>	GU128881.1	GU128895.1	GU128902.1	NZ_JNNU010000 12.1*
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	BA000040.2*	BA000040.2*	BA000040.2*	BA000040.2*

Fonte: Autor \* genoma

**Tabela 4** – Matriz de identidade nucleotídica (%) das estirpes do estudo e referência.

<b>Similaridade</b>	<b>16S rRNA</b>	<b><i>glnII</i></b>	<b><i>recA</i></b>	<b><i>rpoA</i></b>	<b>MLSA</b>
Entre as estirpes estudadas	93,4 - 100	86 – 100	85,6 - 100	85,6 – 100	86,1 - 100
Entre as estirpes do estudo e estirpes de referência					
<i>Rhizobium anhuiense</i>	93,3 – 99,7	87,3 – 94,5	86,5 – 92,1	X	X
<i>Rhizobium alamii</i>	94,7 – 99,3	84,9 – 90	83,3 – 88,8	88 – 96	85,6 – 91,7
<i>Rhizobium calliandrae</i>	93,5 - 99,8	X	86,8 – 91,5	86,6 – 95,2	X
<i>Rhizobium ecuadorensense</i>	93,2 – 99,6	88 – 96,3	85,6 – 91,8	86,6 – 96,5	87,1 – 95,2
<i>Rhizobium etli</i>	93,1 – 99	86,2 – 93,6	85 – 91,2	86,6 – 97	86,2 – 94,1
<i>Rhizobium freirei</i>	93,5 - 99,9	88,2 - 96,3	87,4 – 94,7	89 – 99,2	88,6 – 96,8
<i>Rhizobium gallicum</i>	93,4 – 97,7	86,2 – 90,9	85,6 – 88,5	88 – 95,2	87,6 – 90,8
<i>Rhizobium hainanense</i>	93,5 – 99,7	87,1 – 96,8	87,7 – 98,2	86,3 – 98	88 – 94,3
<i>Rhizobium indigoferae</i>	93,1 – 98	87,6 – 94,1	85,3 – 91,5	X	X
<i>Rhizobium jaguaris</i>	93,5 - 99,7	X	84,7 – 92,1	88 – 96,5	X
<i>Rhizobium larrymoorei</i>	93,8 – 98,8	X	85,3 – 88,5	86,6 – 94,2	X
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	92,9 – 99,3	87,7 – 93,1	85,3 – 91,5	86,6 – 97	86,7 – 94,4
<i>Rhizobium leguminosarum trifoli</i>	93,2 – 99,6	87,1 – 95	85,3 – 91,5	86,6 – 97,2	86,7 - 94,7
<i>Rhizobium laguerreae</i>	93,3 - 99,7	86,2 – 93	85 – 90	87,3 – 95,2	86,4 – 93,4
<i>Rhizobium leucaenae</i>	93,3 – 99,4	87,1 – 94,8	88,8 – 93,2	87,5 – 96,5	88,2 – 94,5
<i>Rhizobium lusitanum</i>	93,5 – 99,8	86,6 – 94,4	86,2 – 91,5	88 - 97,2	87,3 – 4
<i>Rhizobium mayense</i>	93,6 – 99,9	X	85,3 – 91,5	88 – 96,5	X
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	94,7 – 99,1	87,3 – 94,1	86,8 – 91,2	X	X
<i>Rhizobium miluonense</i>	93,6 – 99,9	86,2 – 96,8	87,1 – 94,4	88 – 98,2	87,3 – 96,2
<i>Rhizobium multihospitium</i>	93,5 - 99,8	88 – 94,4	86,2 – 95	88,3 - 98,7	87,8 – 96
<i>Rhizobium paranaense</i>	93,5 - 99,7	87,1 – 94,2	87,7 – 93,5	88,3 – 96,7	88,4 – 94,2
<i>Rhizobium phaseoli</i>	93,2 – 99,6	85,1 – 91,1	86,2 – 91,2	87,3 – 97,2	86,8 – 93,2
<i>Rhizobium pisi</i>	93,3 – 99,7	87,3 – 93,5	85,3 – 91,5	87,8 – 97,7	87,4 – 94,7
<i>Rhizobium pusense</i>	93,5 – 99,9	85,3 - 99,5	88 – 99,7	87 – 99,7	87,3 – 98,3
<i>Rhizobium radiobacter</i>	94,4– 99,6	88 – 94,8	85,9 – 93,5	86,3 – 98	87,3 – 95,2
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	93,4 - 99,6	87,5 – 92,4	84,7 – 91,5	87,5 – 97,5	87,6 – 93,6
<i>Rhizobium rubi</i>	93,6 – 99,8	84,6 – 88,9	83,9 – 87,1	85,8 – 95,2	86,2 – 90,4
<i>Rhizobium sophorae</i>	93,3 – 99,7	86,9 – 94,3	84,7 – 90,3	42,4 – 44,1	72,4 – 76,4
<i>Rhizobium sullae</i>	93,8 – 98,8	87,6 – 90,3	86,5 – 88,3	87,5 – 95,2	88 – 90,6
<i>Rhizobium tropici</i>	92,8 - 99,2	86 – 98,1	85,3 – 96,1	88,5 – 98,5	88,4 – 96,8
<i>Rhizobium vallis</i>	93,5 - 99,7	86,4 - 95,2	86,5 – 92,9	X	X
<i>Rhizobium vignae</i>	94 – 97	87,1 – 90,9	87,4 - 100	87 – 89,8	88,6 – 91,6
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	85,6 – 87,7	83,1 – 86,6	76,9 – 81	79,8 – 81,9	80,5 – 82,7

Fonte: Autor

**Tabela 5** – Informações sobre as sequências das estirpes utilizadas no estudo.

Locus	Estirpes analisadas (n)	Nucleotídeos			Total
		Conservado	Variável	Parcimônia informativa	
16S rRNA	58	858 (83,5%)	161 (15,6%)	85 (8,2%)	1027
<i>glnII</i>	54	277 (62,3%)	167 (37,6%)	123 (27,7%)	444
<i>recA</i>	58	194 (56,5%)	148 (43,1%)	110 (32%)	343
<i>rpoA</i>	53	144 (34,6%)	260 (62,5%)	96 (23,1%)	415
Genes concatenados	50	634 (51,7%)	556 (45,4%)	321 (26,2%)	1224

Fonte: Autor

**Tabela 6** – Números de acesso das estirpes estudadas no trabalho.

<b>Estirpe</b>	<b>16S</b>	<b><i>glnII</i></b>	<b><i>recA</i></b>	<b><i>rpoA</i></b>
1SL Org.	KX884947	MF074245	MF074270	MF074295
6SL Fal.	KX884952	MF074246	MF074271	MF074296
9SQ Org.	KX884884	MF074247	MF074272	MF074297
11SO Con.	KX884928	MF074248	MF074273	MF074298
15SL Fal.	KX884959	MF074249	MF074274	MF074299
16SQ Org.	KX884890	MF074250	MF074275	MF074300
17SQ Fal.	KX884891	MF074251	MF074276	MF074301
18SO Org.	KX884935	MF074252	MF074277	MF074302
22SQ Fal.	KX884895	MF074253	MF074278	MF074304
26SQ Org.	KX884899	MF074254	MF074279	MF074305
27SQ Fal.	KX884900	MF074255	MF074280	MF074306
27SL Org.	KX884970	MF074256	MF074281	MF074307
32SQ Con.	KX884905	MF074257	MF074282	MF074308
36SL Fal.	KX884979	MF074258	MF074283	MF074309
37SQ Fal.	KX884906	MF074259	MF074284	MF074310
39SQ Org.	KX884908	MF074260	MF074285	MF074311
39SL Con.	KX884981	MF074261	MF074286	MF074312
40SQ Org.	KX884909	MF074262	MF074287	MF074313
41SL Con.	KX884982	MF074263	MF074288	MF074314
42SQ Org.	KX884910	MF074264	MF074289	MF074315
42SL Org.	KX884983	MF074265	MF074290	MF074316
43SQ Con.	KX884911	MF074266	MF074291	MF074317
43SL Fal.	KX884984	MF074267	MF074292	MF074318
47SQ Org.	KX884913	MF074268	MF074293	MF074319
50SQ Fal.	KX884916	MF074269	MF074294	MF074320

## 7 REFERÊNCIAS

- ALAMI Y, ACHOUAK W, MAROL C, HEULIN T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66: 3393–3398.
- AMABIS, J. M. & MARTHO, G. R., 1990. *Fundamentos da Biologia Moderna*. Editora Moderna, São Paulo
- AMARGER, N., M. BOURS, F. REVOY, M. R. ALLARD, and G. LAGUERRE. 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* 161:147-156.
- AMARGER, N., MACHERET, V. & LAGUERRE, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47, 996–1006
- AN DS, IM WT, YANG HC, LEE ST (2006) *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:443–448
- ANDREWS, M., SCHOLEFIELD, D., ABBERTON, M. T., MCKENZIE, B. A., HODGE, S., & RAVEN, J. A. (2007). Use of white clover as an alternative to nitrogen fertilizer for dairy pastures in nitrate vulnerable zones in the UK: productivity, environmental impact and economic considerations. *Annals of Applied Biology*, 151(1), 11-23.
- ANDREWS, M., EDWARDS, G., RIDGWAY, H., CAMERON, K., DI, H., & RAVEN, J. (2011). Positive plant microbial interactions in perennial ryegrass dairy pasture systems. *Annals of Applied Biology*, 159(1), 79-92.
- ANTOUN, H., BEAUCHAMP, C. J., GOUSSARD, N., CHABOT, R. & LALANDE, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 204, 57–67
- ANYIA, A.O; HERZOG, H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought, *European Journal of Agronomy*, v.20, n.4, p. 327-339, 2004.
- ARRIGHI J. F., BARRE A., BEN AMOR B., BERSOULT A., SORIANO L. C., MIRABELLA R., et al. (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol.* 142 265–279.
- AULING G, BUSSE HJ, EGLI T, EL-BANNA T, STACKEBRAND TE (1993) Description of the gram-negative, obligately aerobic, nitritotriacetate (NTA)-utilizing bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus saccharovorans*, gen. nov., sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 16:104–112, VALIDATION LIST no. 46. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1993, 43, 624–625.

- BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ci.*, 77:549-579 , 2005.
- BARTSEV A. V., DEAKIN W. J., BOUKLI N. M., MCALVIN C. B., STACEY G., MALNOE P., et al. (2004). NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* 134 871–879.
- BEIJERINCK MW (1888) Die Bacterien der Papilionaceen-knollchen. *Botanische Zeitung* 46:797–804
- BELLONE, S. C. D. & BELLONE, C. H. (2006). Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 1065–1068.
- BERGE O, LODHI A, BRANDELET G, SANTAELLA C, RONCATO MA, CHRISTEN R, HEULIN T, ACHOUAK W (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 367-72.
- BHATTACHARYYA P.N., Jha D.K., Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (2012), pp. 1327–1350.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, The Hague, v. 252, p.139-149, 2003.
- BOHLOOL B B, LADHA J K, GARRITY D P AND GEORGE T 1992 Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil* 141, 1-11.
- BOTHA, W.J., JAFTHA, J.B., BLOEM, J.F., HABIG, J.H. AND LAW, I.J. (2004) Effect of Soil Bradyrhizobia on the Success of Soybean Inoculant Strain CB 1809. *Microbiological Research*, 159, 219-231.
- BROUGHTON, W.J., ZHANG, F., PERRET, X. AND STAEHELIN, C. (2003) Signals Exchanged between Legumes and *Rhizobium*: Agricultural Uses and Perspectives. *Plant and Soil*, 252, 129-137.
- BRUINJIN. F.J. 2015. Biological nitrogen fixation. In: B. Lugtenberg (ed.) *Principles of plant-microbe interactions*. Springer Int. Pub. Switzerland. Pp. 215-224. doi: 10.1007/978-3-319-08575-3\_23
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 807-838, 2013.
- BURGESS BK, LOWE DJ: Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev* 1996, 96:2983-3012.
- BURK, D.; LINEWEAVER, H.; HORNER, C. K. J. *Bacteriol.* 1934, 27, 325
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. *Science* 2010, 330, 192.

CASIDA LE (1982) *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* 32:339–345

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 39, p. 941-947, 1993.

CHABOT, R., ANTOUN, H., KLOEPPER, J.W. AND BEAUCHAMP, C.J. 1996b. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2767-2772.

CHAHBOURNE R, CARRO L, PEIX A, BARRIJAL S, VELASQUEZ E, BEDMAR EJ. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011;61:2922-2927.

CHAN, J. Z. M., HALACHEV, M. R., LOMAN, N. J., CONSTANTINIDOU, C. & PALLEN, M. J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol* 12, 302.

CHEN-WU JL, et al. (1988) Isolation, sequencing, and disruption of the CKA1 gene encoding the alpha subunit of yeast casein kinase II. *Mol Cell Biol* 8(11):4981-90

CHEN H, RICHARDSON AE, CARTNER E, DIORDJEVIC MA, ROUGHLEY RJ AND ROLFE BG. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991;57:2005-2011.

CHENG, Q. J. *Integr. Plant Biol.* 2008, 50, 786.

CHIWOCHA, S.D.S., ABRAMS, S.R., AMBROSE, S.J., CUTLER, A.J., LOEWEN, M., ROSS, A.R.S. AND KERMODE, A.R. (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35, 405–417.

CHO, J.-C., AND J. M. TIEDJE. 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5448–5456

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. *Agricultura Tropical*, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000b.

CHUEIRE, L.M.O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizobio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA, *Revista Brasileira de Ciência do Solo* v.27, p.833-840, 2003

CROZIER, A.; KAMIYA, K.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. 2001. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W. & Russel, L. J. (eds). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Courier Companies Inc., New York, USA, p.850-929.

DAKORA F. D., JOSEPH C. M., PHILLIPS D. A. (1993). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 101 819–824.

DALL'AGNOL, R. F., RIBEIRO, R. A., DELAMUTA, J. R. M., ORMENO-ORRILLO, E., ROGEL, M. A., ANDRADE, D. S., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & HUNGRIA, M. (2014). *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 3222-3229.

DALL'AGNOL, R. F., RIBEIRO, R. A., ORMENO-ORRILLO, E., ROGEL, M. A., DELAMUTA, J. R., ANDRADE, D. S., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & HUNGRIA, M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4167–4173.

DALTON, D.A. & KRAMER, S. (2006). Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In *Springer Netherlands, Dordrecht* pp. 105-130.

DANGEARD (P.A.): Recherches sur les tubercles radicaux des Légumineuses. *Botaniste (Paris)*, 1926, **16**, 1-275.

DEAKIN, W. J., AND BROUGHTON, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: Rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 312–20.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2180-2187, 1992

DE LAJUDIE (P.), WILLEMS (A.), POT (B.), DEWETTINCK (D.), MAESTROJUAN (G.), NEYRA (M.), COLLINS (M.D.), DREYFUS (B.), KERSTERS (K.) and GILLIS (M.): Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, **44**, 715-733.

DE LAJUDIE P, LAURENT-FULELE E, WILLEMS A, TORCK U, COOPMAN R, COLLINS MD, KERSTERS K, DREYFUS B, GILLIS M (1998) *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* 48:1277–1290.

DELAMUTA J.R.M., RIBEIRO R.A., ORMEÑO-ORRILLO E., MELO I.S., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63:3342–3351.

DEMEZAS, D. H.; REARDON, T. B.; WATSON, J. M.; GIBSON, A. H. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, p. 3489-3495, 1991.

DÉNARIÉ J, DEBELLÉ F, PROMÉ J-C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 1996;65:503–35.

D'HAENZE, W. AND HOLSTERS, M. (2002) Nod Factor Structures, Responses, and Perception during Initiation of Nodule Development. *Glycobiology*, 12, 79R-105R.

DIIGNON-BOURCIER, F., WILLEMS, A., COOPMAN, R., LAGUERRE, G., GILLS, M., DE LAJUDIE, P., "Genotypic Characterization of Bradyrhizobium Strains Nodulating Small Senegalese Legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses", *Appl Environ Microbiol*, 66: 3987-3997. 2000.

DOIGNON-BOURCIER, F., A. WILLEMS, R. COOPMAN AND G. LAGUERRE, 2000. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating small senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3987–97.

Downie J.A., and Parniske M. (2002). Plant biology. Fixation with regulation. *Nature* 420 369-370.

DREYFUS (B.), GARCIA (J.L.) and GILLIS (M.): Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1988, 38, 89-98.

DUTTA, S., A.K. MISHRA AND B.K.D. KUMAR, 2007. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 452-461.

DYACHOK JV, TOBIN AE, PRICE NPJ, VON ARNOLD S. Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Rep.* 2000;19:290–297.

EARDLY B D, YOUNG J P W AND SELANDER K 1992 Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1809–1815.

EARDLY, B.D., NOUR, S.M., VAN BERKUM, P. & SELANDER, R.K. 2005. Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1328-1335.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (2015).  
www.embrapa.br/web/fbn/soja

ELBANNA SM, ZALAT SM, GILBERT F, ELLIOTT S & SHUKER DM (2009)  
Patterns of resource use by milkweed insects in Sinai. Egyptian Journal of  
Biology 11: 58-70.

ELBOUTAHIRI N., THAMI-ALAMI I. AND UDUPA S.M., 2010. Phenotypic and  
genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt  
affected regions of Morocco. In: BMC Microbiology, 10, p. 15.

ERISMAN JW, SUTTON MA, GALLOWAY JN, KLIMONT Z, WINIWARTER W  
(2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature  
Geosciences 1: 636-639

ESKIN, N. (2012). Colonization of *Zea mays* by the nitrogen fixing bacterium  
*Gluconacetobacter diazotrophicus*. Unpublished Dissertation at the School of  
Graduate and Postdoctoral Studies for Award of MSc Degree at University of  
Western Ontario, London, Canada, p 562.

EUZÉBY JP AND FINDALL BJ. Status of strains that contravene rules 27 (3)  
and 30 of the Bacteriological Code. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol.  
Microbiol. 2004;54:293-301.

FAO, IFAD and WFP. 2015. The State of Food Insecurity in the World 2015.  
Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress.  
Rome, FAO.

FAUVART, M., AND MICHIELS, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as  
determinants of Host specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. FEMS  
Microbiol. Lett. 285, 1–9.

FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: *an approach using  
bootstrap*. Evolution **39**: 783–791.

FERGUSON, S. J. Curr. Opin. Chem. Biol. 1998, 2, 182.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de  
rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros  
de Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 7, p. 835-842,  
jul. 2003.

FOURNIER, J., TEILLET, A., CHABAUD, M., IVANOV, S., GENRE, A.,  
LIMPENS, E., et al. (2015). Remodeling of the infection chamber prior to  
infection Thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry in  
to the host legume root hair. Plant Physiol. 167, 1233–12342.

FRANCHE, C.; LINDSTROM K.; ELMERICH C. Nitrogen fixing bacteria  
associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil, 321: 35-59,  
2009.

FRANK B (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber Dtsch Bot Ges  
7:332–346

FTERICH, A.; MAHDHI, M.; CAVIEDES, M.A.; PAJUELO, E.; RIVAS, R.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D. & MARS, M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Arch Microbiol*, 93:385-397, 2011.

GAGE, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280–300.

GALLOWAY JN, DENTENER FJ, CAPONE DG et al (2004) Nitrogen cycles: Past, present, and future, *Biogeochemistry*, 70: 153–226.

GARCIA JL, CAYOL JL ET ROGER P. Taxonomie des Procaryotes. Rhizobiales, Ordre VI des Alpha-proteobacteria, Classe 1 des Proteobactéries, Phylum BXIII du Domaine bacteria. Accessed in May 2012.

GARCÍA-FRAILE P, CARRO L, ROBLEDO M, RAMÍREZ-BAHENA M-H, FLORES-FÉLIX J-D, FERNÁNDEZ MT, et al. (2012) *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS ONE* 7(5): e38122.

GARRITY, G. M. & HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, SpringerVerlag, v.1., p.119-166, 2001.

GARRITY, G.M., WINTERS, M. & SEARLES, D.B. 2001. Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Release 1.0, Apr 2001: 1-39.

GEVERS D, et al. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3:733–739.

GIRAUD E., MOULIN L., VALLENET D., BARBE V., CYTRYN E., AVARRE J. C., et al. (2007). Legume symbiosis: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316 1307–1312.

GLICK BR, TODOROVIC B, CZARNY J, CHENG Z, DUAN J, et al. (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26: 227-242.

GRAHAM PH, PARKER CA (1964). Diagnostic features in the characterization of root nodules bacteria of legumes. *Plant Soil* 20:383-394.

GRAHAM P H, SADOWSKY M J, KEYSER H H, BARNET Y M, BRADLEY R S, COOPER J E, DE LEY J, JARVIS B D W, ROSLYCKY E B, STIJDOM B W AND YOUNG J P W 1991 Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 582–587.

GRAHAM, P.H., DRAEGER, K.J., FERREY, M.L., CONROY, M.J., HAMMER, B.E., MARTINEZ, E., AARONS, S.R. AND QUINTO, C. (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the

basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* Umr1899. *Can J Microbiol* 40, 198–207.

GRAHAM, P.H. & VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, v. 65, p. 93-107, 2000.

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

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, Brisbane, v. 39, n. 4, p. 867-876, 2007.

GRESSHOFF PM. The contrasting need for food and biofuel: can we afford biofuel? In: *A love of ideas*. Melbourne: Melbourne University Press; 2014. p. 144–52.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. *Nature* 2008, 451, 293.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*, v. 91, p. 117-126, 2001.

GWATA, E., WOFFORD, D.S., BOOTE, K. AND MUSHORIWA, H. (2004) Determination of Effective Nodulation in Early Juvenile Soybean Plants for Genetic and Biotechnology Studies. *African Journal of Biotechnology*, 2, 417-420

GYÖRGYPAL, Z., IYER, N. AND KONDOROSI, A. (1988) Three Regulatory nodD Alleles of Diverged Flavonoid-Specificity Are Involved in Host-Dependent Nodulation by *Rhizobium meliloti*.

HABER, F. *Naturwissenschaften* 1923, 11, 339.

HAHN, L. et al. Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, v.14. n.1, p.11-16, 2014.

HALVERSON L. J., Stacey G. (1986). Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* 50 193–225.

HARRISON, P.; MYTTON, L.R.; SKØT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.

HARRISON, P.W., LOWER, R.P.J., KIM, N.K.D. & YOUNG, J.P.W. 2010. Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends in Microbiology* 18: 141-148.

HARU, A. AND ETHIOPIA, W. (2012) Influences of Inoculation Methods and Phosphorus Levels on Nitrogen Fixation Attributes and Yield of Soybean

(Glycine max L.). American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology, 2, 45-55.

HASSAN S., MATHESIUS U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. J. Exp. Bot. 10.1093/jxb/err430 Molecular and General Genetics MGG, 212, 85-92.

HAUKKA, K., LINDSTROM, K. & YOUNG, J. P. W. (1998). Three phylogenetic groups of nodA and nifH genes in Sinorhizobium and Mesorhizobium isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. Appl Environ Microbiol 64, 419–426.

HEDGES, S. B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p-value in phylogenetic studies. Molecular Biology and Evolution 9 366–369.

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

HERRIDGE DF, PEOPLES MB AND BODDEY RM. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil 311: 1-18.

HÖFLICH, G. 2000. Colonization and growth promotion of non-legumes by Rhizobium bacteria. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, Brylinsky M and Johnson-Green P (eds). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. pp: 827-830.

HUMPHRY, D.R., M. ANDREWS, S.R. SANTOS, E.K. JAMES, L.V. PERIN, V.M. REIS AND S.P. CUMMING. 2007. Phylogenetic assignment and mechanism of action of crop growth promoting Rhizobium radiobacter strain used as a biofertilizer on graminaceous crops in Russia. Antonie van leewenhoek 91: 105-113.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Field Crops Research, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M. Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos n. 325, Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO. R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a

análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14., Bonito, 2008. Programa e resumos... s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. p.12.

HUNGRIA, M., AND KASCHUK, G. 2014. Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. *Environ. Exp. Bot.* 98:32-39.

IM W, YOKOTA A, KIM M, LEE S (2004) *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel  $\alpha$ -proteobacterium. *J Gen Appl Microbiol* 50:249–254

JACCARD P. (1912): The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11(2):37-50.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil*, v. 356, n.1, p. 1 - 3, 2012.

JANDA JM, ABBOTT SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45: 2761-2764. doi:10.1128/JCM.01228-07. PubMed: 17626177.

JARVIS, B. D. W., C. E. PANKHURST, and J. J. PATEL. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:378-380.

JARVIS, B.B., Y.W. LEE, S.N. COMEZOGU AND C.S. YATAWARA, 1986. Trichothecenes produced by *Stachybotrys atra* from Eastern Europe. *Applied Environ. Microbiol.*, 51: 915-918.

JENSEN, M. A., WEBSTER, J. A. & STRAUS, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 59, 945–952.

JENSEN ES, PEOPLES MB, BODDEY RM, GRESSHOFF PM, HAUGGAARD-NIELSEN H, ALVES BJR, MORRISON MJ (2012) Legumes for mitigation of climate change and feedstock in a bio-based economy – A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 329-364.

JIA, H.-P.; QUADRELLI, E. A. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 547.

JIAO Y. S., H. YAN, Z. J. JI, Y. H. LIU, X. H. SUI, E. T. WANG, B. L. GUO, W. X. CHEN, W. F. CHEN F; *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* February (2015), 65, 497–503 DOI 10.1099/ijs.0.068916-0.

JORDAN DC (1984) Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: Krieg N, Holt RG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 1st edn. TheWilliams and Wilkins, Baltimore, pp 234–235.

JUDD, A. K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically

- related Bradyrhizobium japonicum serocluster 123 strains. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, p. 1702-1708, 1993.
- KANG BG, KIM WT, YUN HS, CHANG SC (2010) Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. Plant Biotechnol Rep 4: 179-183.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. & CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. Appl. Soil Ecol., 32:210-220, 2006.
- KAY, H.E., COUTINHO, H.L.C., FATTORI, M., MANÆO, G.P., Good-acre, R., Nuti, M.P., et al . (1994) The identification of Brady-rhizobium japonicum strains isolated from Italian soils. Microbiology 140: 2333±2339.
- KHAN MS , A ZAIDI, PA WANI, M OVES; 2010 Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils: A review Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants, 319-350.
- KHALID, A., M. ARSHAD AND Z.A. ZAHIR. 2006. Phytohormones: microbial production and applications. In: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. (Eds.): N. Uphoff , A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies. Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, Florida. p. 207-220.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
- KIRCHNER (O.): Die Wurzelknöllchen der Sojabohne. Beitrage zur Biologie der Pflanzen, 1896, 7, 213-224.
- KITTIWONGWATTANA, C. AND THAWAI, C. 2014. Rhizobium lemnae sp. nov., a bacterial endophyte of Lemna aequinoctialis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64, 2455-2460.
- KLOEPPER, J.W., BEAUCHAMP, C.J., 1992. A review of issues related to measuring of plant roots by bacteria. Canadian Journal of Microbiology.38, 1219-1232.
- KONSTANTINIDIS, K. T., AND TIEDJE, J. M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J. Bacteriol.* 187, 6258–6264. doi: 10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005
- KONSTANTINIDIS, K. T., RAMETTE, A. & TIEDJE, J. M. (2006). Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. Appl Environ Microbiol 72, 7286–7293.
- KRAWIEC S, RILEY M. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol Rev. 1990;54:502–539.
- KUMAR, G.K. AND M.R. RAM, 2014. Phosphate solubilizing rhizobia isolated from Vigna trilobata. American Journal of Microbiological Research, 2: 105-109.

- KUYKENDALL LD (2005) Family I. Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Stanley JT (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Springer, New York, pp 324–361.
- KUYKENDALL, L. D., YOUNG, J. M., MARTÍNEZ-ROMERO, E., KERR, A. AND SAWADA, H. 2015. Rhizobium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–36.
- LAFAY, B. & BURDON, J.J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:396-402, 2001.
- LAGUERRE, G., FERNANDEZ, M. P., EDEL, V., NORMAND, P. & AMARGER, N. (1993). Genomic heterogeneity among French Rhizobium strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int J Syst Bacteriol* 43, 761–767.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F. & AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:56-63, 1994.
- LAGUERRE, G. S.M. NOUR, V. MACHERET, J. SANJUAN, P. DROUIN, N. AMARGER, 2001, Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *phaseolus vulgaris* symbionts *microbiology*, pp. 981–993
- LAGUERRE, G., LOUVRIER, P., ALLARD, M.R., AND AMARGER, N. (2003) Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2276-2283.
- LANG (E.), SCHUMANN (P.), ADLER (S.), SPRÖER (C.) and SAHIN (N.): Azorhizobium oxalatophilum sp. nov., and emended description of the genus Azorhizobium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, 63,1505-1511
- LAPAGE S. P. , SNEATH P. H. A. , LESSEL E. F. , SKERMAN V. B. D. , SEELIGER H. P. R. , CLARK W. A. (editors) ( 1992 ). *International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision)*. *Bacteriological Code*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- LEE M, WOO SG, TEN LN (2011) *Shinella daejeonensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2123–2128
- LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. & MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1215-1226, 2009.
- LEUNG, K.; STRAIN, S. R.; BRUJIN, F. J.; BOTTOMLEY, P. J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, p. 416-426, 1994.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A. & LOCK, J.M. 2005. *Legumes of the World*. Kew, Royal Botanic Gardens.

- LI AL, WANG ML, ZHOU RH, KONG XY, HUO NX, WANG WS, and JIA JZ. 2005. Comparative analysis of early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in compatible and incompatible wheat-powdery mildew interactions. *Plant Pathology* 54: 308–316.
- LI B, (2016) Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N<sub>2</sub> fixation. 156 Proceedings of the National Academy of Sciences:201523580.
- LIGHTFIELD J, FRAM NR, ELY B (2011) Across Bacterial Phyla, Distantly-Related Genomes with Similar Genomic GC Content Have Similar Patterns of Amino Acid Usage. *PLoS ONE* 6(3): e17677. doi:10.1371/journal.pone.0017677
- LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R. & MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40:1095-1104, 2005.
- LIMPENS E., FRANKEN C., SMIT P., WILLEMSE J., BISSELING T., GEURTS R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302 630–633.
- LIN SW, SHIEH HC, WANG YW, GNIFFKE PA, TAN CW, SCHAFLEITNER R, YANG WJ, KUMAR S (2015). Restorer breeding in sweet pepper: Introgressing Rf allele from hot pepper through marker-assisted backcrossing. *Scientia Horticulturae* 197:170–175.
- LIN, D. X., WANG, E. T., TANG, H., HAN, T. X., HE, Y. R., GUAN, S. H. & CHEN, W. X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1409–1413.
- LIN, S.-Y., HSU, Y.-H., LIU, Y.-C., HUNG, M.-H., HAMEED, A., LAI, W.-A., YEN, W.-S. and YOUNG, C.-C. 2014. *Rhizobium straminoryzae* sp. nov., isolated from the surface of rice straw. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 2962-2968
- LINDSTROM J, ANAND R, PENG X, GERZANICH V, WANG F AND LI Y (1995) Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 757:100–116.
- LINDSTRÖM, K., AMSALU ASERSE, A. & MOUSAVI, S.A. 2015. Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. *Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 21-38
- LIU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legume *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, p. 465-477, 2005.
- LONG, S. R. (1996). *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885–1898.
- LÓPEZ-GUERRERO, M.G., ORMEÑO-ORRILLO, E., VELÁZQUEZ, E., ROGEL, M.A., ACOSTA, J.L., GÓNZALEZ, V., MARTÍNEZ, J., MARTÍNEZ-ROMERO, E., 2012. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* In Press. Available online 1 August 2012.

LÓPEZ-LÓPEZ, A., ROGEL-HERNÁNDEZ, M.A., BAROIS, I., ORTIZ CEBALLOS, A.I., MARTÍNEZ, J., ORMEÑO-ORRILLO, E., AND MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2012. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2264–2271.

LOUREIRO, M.F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.) *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, p.183-199.

LU, J., KANG, L., HE, X. & XU, D. (2011). Multilocus sequence analysis of the rhizobia from five woody legumes in Southern China. *Afr J Microbiol Res* 5, 5343–5353

LUPWAYI, N.Z., KENNEDY, A.C., CHIRWA, R.M. 2011. Grain legume impacts on soil biological processes in Sub-Saharan Africa. *African Journal of Plant Science*. 5:1-7.

MACKAY, B. A.; FRYZUK, M. D. *CHEM. Rev.* 2004, 104, 385.

MADSEN E. B., MADSEN L. H., RADUTOIU S., OLBRYT M., RAKWALSKA M., SZCZYGLOWSKI K., et al. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425 637–640.

MANFIO, G. P. Avaliação dos estados do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP. *Microbiota* (2003).

MARTENS, M., DELAERE, M., COOPMAN, R., DE VOS, P., GILLIS, M. & WILLEMS, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 489–503.

MARTENS, M., DAWYNDT, P., COOPMAN, R., GILLIS, M., DE VOS, P. & WILLEMS, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 200–214.

MARTINEZ L, CABALLERO-MELLADO J, OROZCO J, MARTINEZ-ROMERO E. 2003. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant and Soil* 257:35-47.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P., RAMÍREZ-BAHENA, M. H., FLORES-FELIX, J. D., RIVAS, R., IGUAL, J. M., MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., LÉON-BARRIOS, M., PEIX, A. and VELÁZQUEZ, E. 2015. Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1703-1708.

MARTÍNEZ-ROMERO, E., L. SEGOVIA, F. M. MERCANTE, A. A. FRANCO, P. GRAHAM, and M. A. PARDO. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species

nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, v.38, p.333-339, 2003.

MASSON-BOIVIN C., GIRAUD E., PERRET X., BATUT J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17 458–466.

MATIRU VN, DAKORA FD. 2005. Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. *New Phytologist* 165: 847–857.

MATSUI T, SHINZATO N, TAMAKI H, MURAMATSU M, HANADA S (2009) *Shinella yambaruensis* sp. nov., a 3-methyl-sulfolane-assimilating bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:536–539

MCGLYNN, S. E.; BOYD, E. S.; PETERS, J. W.; ORPHAN, V. J. *Front. Microbiol.* 2013, 3, 419.

MCINROY, J.A., and KLOEPPER, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 173: 337 -342.

MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK H-P AND GÖKER M (2014) Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:352–356.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A. & SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:235-246, 2006.

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

MEYER S.E.D (2005) Genus IV *Carbophilus*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley J (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, volume two the proteobacteria, part C the alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria. Springer, New York, pp 346–347.

MIGNARD, S.; FLANDROIS. J.P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J. Microbiol. Methods.* 67 (3), 574-581.

MIRANSARI, M.\*, SMITH, D.L. 2014. Improving Soybean (*Glycine max* L.) N<sub>2</sub> Fixation under Salinity Stress. LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany. ISBN: 978-3-659-53717-2.

MISHRA RP, TISSEYRE P, MELKONIAN R, CHAINTREUIL C, MICHE´ L, KLONOWSKA A, GONZALEZ S, BENA G, LAGUERRE G & MOULIN L (2012) Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other betarhizobia. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 487–503.

MONTEIRO, R. et al. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *Fems Microbiology Ecology*, v. 80, n. 2, p. 441-451, 2012.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MOREIRA, F. M. de S.; FARIA, S. M. de; BALEIRO, F. de C; FLORENTINO, L. A. Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: *Biotecnologia aplicada a agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais*. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Hélio Almeida Burity, José de Paula Oliveira, Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos, Newton Pereira Stamford, Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife – PE: Instituto agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010, 761 p.

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

MOUSAVI, S. A., ÖSTERMAN, J., WAHLBERG, N., NESME, X., LAVIRE, C., VIAL, L., PAULIN, L., DE LAJUDIE, P. and LINDSTRÖM, K. 2014. Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 37, 208-215.

MOORE D., STECHBART M. (2010) *City of Quito: ECOLOGICAL FOOTPRINT ANALYSIS* Global Footprint Network, Oakland, California, United States of America.

MYROLD, D.D., BOTTOMLEY, P.J., 2007. Nitrogen mineralization and immobilization. In: Raun, W., Schepers, J.S. (Eds.), *Nitrogen in Agricultural Soils*. American Society of Agronomy, Madison, WI in press.

NIEMANN, S., PÜHLER, A., TICHY, H.-V., SIMON, R. AND SELBITSCHKA, W. (1997) Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology* 82, 477–484.

NOUR SM, FERNANDEZ MP, NORMAND P AND CLEYET-MAREL JC. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994;44:511-522.

OLDROYD, G.E.D., and DOWNIE, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 519–546.

OLDROYD GED, MURRAY JD, POOLE PS, DOWNIE JA. The rules of engagement in the legume–rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 2011; 45:119–44.

OSORIO FILHO, B.D. et al. Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. *American and Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, v.14. n.8, p.707-718, 2014.

OVTSYNA A. O., GEURTS R., BISSELING T., LUGTENBERG B. J. J., TIKHONOVICH I. A., SPAINK H. P. (1998). Restriction of host range by the sym2 allele of Afghan pea is nonspecific for the type of modification at the reducing terminus of nodulation signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11 418–422.

PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, p. 2279-2285, 1996.

PARTE AC (2014) LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D613–D616.

PENG, G., YUAN, Q., LI, H., ZHANG, W. & TAN, Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2158–2163

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 103-110, 2001.

PEIX, A., RAMÍREZ-BAHENA, M. H., FLORES-FÉLIX, J. D., ALONSO DE LA VEGA, P., RIVAS, R., MATEOS, P. F., IGUAL, J. M., MARTÍNEZ-MOLINA, E., TRUJILLO, M. E. and VELÁZQUEZ, E. 2015. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1213-1219.

PEOPLES M B AND CRASSWELL E T 1992 Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil* 141, 13-39.

PERRINE-WALKER FM, GARTNER E, HOCART CH, BECKER A, ROLFE BG . Rhizobium-initiated rice growth inhibition caused by nitric oxide accumulation. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 2007;20:283-292.

POOLE PS, SCHOFIELD NA, REID CJ, DREW EM & WALSHAW DL (1994) Identification of chromosomal genes located downstream of *dctD* that affect the requirement for calcium and the lipopolysaccharide layer of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 140: 2797–2809.

POPELKA, C., TERRY, N. & HIGGINS, T. (2004). Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries?. *Plant Science*, Vol. 167, No. 2, pp 195-206, ISSN 01689452.

PREVOST D, DROUIN P, LABERGE S, BERTRAND A, CLOUTIER J, LEVESQUE G (2003) Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Can J Bot* 81:1153–1161.

PUŁAWSKA, J., WILLEMS, A., DE MEYER, S. E. & SULE, S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst Appl Microbiol* 35, 215–220.

RADUTOIU S., MADSEN L. H., MADSEN E. B., FELLE H. H., UMEHARA Y., GRØNLUND M., et al. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425 585–592.

RAMIREZ-BAHANA MH, PEIX A, RIVAS R, CAMACHO M, RODRIGUEZ-NAVARRO DN, MATEOS PF, MARTINEZ-MOLINA E, WILLEMS A AND VELASQUEZ E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009;59:1929-1934.

RAMIREZ-BAHANA MH, CHAHBOUNE R, PEIX A, VELASQUEZ E. Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013;63:1013-1016.

RAMOS P. L., VAN TRAPPEN S., THOMPSON F. L., ROCHA R. C., BARBOSA H. R., DE VOS P., et al. (2011). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61 926–931. 10.1099/ijs.0.019372-0

RASHID, M. H., YOUNG, J. P. W., EVERALL, I., CLERCX, P., WILLEMS, A., SANTHOSH BRAUN, M. and WINK, M. 2015. Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 3037-3045.

RASHID, M. H., SCHÄFER, H., GONZALEZ, J. & WINK, M. (2012). Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. *Syst Appl Microbiol* 35, 98–109.

RASHID, M. H., GONZALEZ, J., YOUNG, J. P. W. & WINK, M. (2014). *Rhizobium leguminosarum* is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. *FEMS Microbiol Ecol* 87, 64–77

RAZON, L.F. 2014. Life cycle analysis of an alternative to the haber-bosch process: Non-renewable energy usage and global warming potential of liquid ammonia from cyanobacteria. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 33:618-624. doi: 10.1002/ep.11817

REEVE W, CHAIN P, O'HARA G, ARDLEY J, NANDESENA K, BRAU L, TIWARI R, MALFATTI S, KISS H, LAPIDUS A, CO-PELAND A, NOLAN M, LAND M, HAUSER L, CHANG Y, IVANOVA N, MAVROMATIS K, MARKOWITZ V, KYRPIDES N, GOLLAGHER M, YATES R, DILWORTH M, HOWIESON J (2010) Complete genome sequence of the Medicago microsymbiont Ensifer (Sinorhizobium) medicae strain WSM419. *Stand Genomic Sci* 2:77–86

REIS, V. M.; OLIVEIRA A. L. M.; BALDANI V. L. D.; OLIVARES F. L.; BALDANI J. I. Fixação biológica de Nitrogênio Simbiótica e associativa. In: Fernandes S. M. *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, SBCS. Cap.VI, p: 154- 174, 2006.

RIBEIRO, R. A., ROGEL, M. A., LÓPEZ-LÓPEZ, A., ORMEÑO-ORRILLO, E., GOMES BARCELLOS, F., MARTÍNEZ, J., LOPES THOMPSON, F., MARTÍNEZ-ROMERO, E. & HUNGRIA, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1179-1184.

RIBEIRO R.A., ORMENO-ORRILLO E, DAM'AGNOL RF, GRAHAM PH, MARTINEZ- ROMERO E, HUNGRIA M: Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology* 2013.

RIBEIRO, R. A., MARTINS, T. B., ORMEÑO-ORRILLO, E., MARCON DELAMUTA, J. R., ROGEL, M. A., MARTÍNEZ-ROMERO, E. and HUNGRIA, M. 2015. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 3162-3169.

RICE-EVANS, C. (2001) Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797-807.

RICHTER, M., AND ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19126– 19131.

RIVAS, R., GARCÍA-FRAILE, P., & VELÁZQUEZ, E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*, 2(1), 51-69.

RIVAS R., MARTENSA M., DE LAJUDIE P., WILLEMS A., 2009. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol.* 32: 101-110.

RIVAS R, WILLEMS A, PALOMO JL, GARCIA-BENAVIDES P, MATEOS PF, MARTINEZ-MOLINA E, GILLIS M. AND VELAZQUEZ E. "Bradyrhizobium betae sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004;54:1271-1275.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, v. 12, n. 1-2. p. 16, 1986.

ROSSBACH, S., MCSPADDEN, B., GANOFF, M. & DE BRUIJN, F. J. (1995a). *Rhizobium meliloti* rhizopine catabolism genes : distribution, role in competition

and potential as marker gene to track microbes. In *Biotechnology Risk Assessment*, pp. 180-188. Edited by M. Levin, C. Grim & J. S. Angle. College Park, MD: University of Maryland Biotechnology Institute.

ROSSELLO´-MORA, R. & AMANN, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25, 39–67.

ROYCHOWDHURY, R., U. BANERJEE, S. SOFKOVA AND J. TAH, 2013. Organic farming for crop improvement and sustainable agriculture in the era of climate change. *OnLine J. Biol. Sci.*, 13: 50-65.

ROZAHON, M., ISMAYIL, N., HAMOOD, B., ERKIN, R., ABDURAHMAN, M., MAMTIMIN, H., ABDUKERIM, M., LAL, R. and RAHMAN, E. 2014. *Rhizobium populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 3215-3221.

SADOWSKY, M.J. & MOAWAD, H.A. The use of rep-PCR DNA fingerprinting to examine competition for nodulation among genetically-related *Bradyrhizobium japonicum*. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, V.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Ed.) *Nitrogen fixation: Fundamental and applications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.673.

SAITOU, N., AND M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406 – 425.

SAWADA, H., KUYKENDALL, L. D. & YOUNG, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49, 155–179.

SANTOS SR & OCHMAN H (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol* 6: 754–759

SCHLEIFER, K. H. (2009). Family V. *Leuconostocaceae* fam. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol 3, The Firmicutes, pp. 624. Edited by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer & W. B. Whitman. New York: Springer.

SCHOLLA MH, ELKAN GH (1984) *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 34(4):484–486

SEEFELDT LC, HOFFMAN BM, DEAN DR: Mechanism of Modependent nitrogenase. *Ann Rev Biochem* 2009, 78:701-722.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:374-377, 1993.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 79, p. 425- 431, 1995.

SELENSKA-POBELL, S., EVGUENIEVA-HACKENBERG, E., RADEVA, G., SQUARTINI, A. 1996 Characterization of *Rhizobium 'hedisari'* by RFLP analysis of OCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**, 517-528.

SHARMA SB, SAYYED RZ, TRIVEDI MH, GOBI TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus. 2013 Oct 31;2:587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587. eCollection 2013. Review

S. SIKORA, S. REDŽEPOVIĆ, I. PEJIĆ, V. KOZUMPLIK Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting *J. Appl. Microbiol.*, 82 (1997), pp. 527–531

SILVA C., VINUESA P., EGUIARTE L. E., SOUZA V., MARTÍNEZ-ROMERO E. (2005). Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol Ecol* **14**, 4033–4050.

SIMMS, E.L. AND TAYLOR, D.L. (2002) Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 369-380.

SIRONVAL, C., BONNIER, C. AND VERLINDEN, J.P. (1957) Action of Day-Length on Nodule Formation and Chlorophyll Content in Soybean. *Physiologia Plantarum*, 10, 697-707.

SKORPIL P., SAAD M. M., BOUKLI N. M., KOBAYASHI H., ARES-ORPEL F., BROUGHTON W. J., et al. (2005). NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol. Microbiol.* 57 1304–1317.

SHARMA, S.; ANEJA, M.K.; MAYER, J.; MUNCH, J.C.; SCHLOTTER, M. (2005a) Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. *Applied Environment Microbiology*. v. 71, p.2001-2007, 2005.

SHILEV S (2013) Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, India, 147-50.

SMIL, V. *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*; MIT Press: Cambridge, MA, 2004.

SOTO M. J., DOMÍNGUEZ-FERRERAS A., PÉREZ-MENDOZA D., SANJUÁN J., OLIVARES J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol.* 11 381–388.

SPAINK, H.P. (2000) Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54, 257-288.

SPRENT J. *Legume nodulation: a global perspective*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.

STACKEBRANDT E, GOEBEL BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846–849.

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., 2002. Report on the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1043–1047.

STAEHELIN, J., J. THUDIUM, R. BÜHLER, A. VOLZ-THOMAS, AND W. GRABER, 1994: Surface ozone trends at Arosa (Switzerland), *Atmos. Environ.*, 28, 75–87.

STALEY JT (2009) The phylogenomic species concept. *Microbiology Today (SGM)*, May 2009, pp. 80-83

STOLTZENBERG, D. 2014. Fritz Haber: Chemist, Nobel laureate, Jew. Philadelphia, Chemical Heritage Press. ISBN 0-941901-24-6.

STREETER, J.G. (1994) Failure of Inoculant Rhizobia to Overcome the Dominance of Indigenous Strains for Nodule Formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 513-522.

TAIZ. L.; ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, Brasil, 719pp.

TAMAMES, J. & ROSSELLÓ-MÓRA, R. 2012. On the fitness of microbial taxonomy. *Trends in Microbiology* 20: 514-516.

TAN, Z., HUREK, T., VINUESA, P., MULLER, P., LADHA, J. K. & REINHOLDHUREK, B. (2001b). Specific detection of Bradyrhizobium and Rhizobium strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S–23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol* 67, 3655–3664.

TARIQ, M., HAMEED, S., YASMEEN, T., ZAHID, M., ZAFAR, M. 2014. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30(2): 719–725.

TEREFEWOR Z., KAIJALAINEN S., LINDSTROM K. (2001) AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J. Biotechnol.*, 91, 169–180.

THAMDRUP, B. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2012, 43, 407.

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, C.C., CHIMETTO, L., EDWARDS, R.A., SWINGS, J., STACKEBRANDT, E. & THOMPSON, F.L. 2013. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14: 913-913.

TINDALL, B. J., ROSSELLO-MORA, R., BUSSE, H.-J., LUDWIG, W. & KÄMPFER, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249–266.

TORRES-RUIZ JM, COCHARD H, DELZON S. 2016. Why do trees take more risks in the Amazon? *Journal of Plant Hydraulics* 3: e005

TRINICK MJ. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bact.* 1980;49:39-53.

VAN BERKUM, P., and J. j. fuhrmann. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2165-2172.

VAN BERKUM, P., R. B. NAVARRO, AND A. A. T. VARGAS. 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hupt) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:554-561.

VAN BERKUM, P., TEREFEWORK, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S., LINDSTRÖM, K., EARDLY, B.D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia. *J. Bacteriol.* 185, 2988–2998, 2003.

VANDAMME P, B POT, M GILLIS, P DE VOS, K KERSTERS, J SWINGS, (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* 60 (2), 407-438.

VAZ-MOREIRA (I.), FARIA (C.), LOPES (A.R.), SVENSSON (L.A.), MOORE (E.R.B.), NUNES (O.C.) and MANAIA (C.M.): *Shinella fusca* sp. nov., isolated from domestic waste compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60, 144-148.

VERSALOVIC, J.; SCNEIDER, M.; De BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology*, New York, v.5, p.25-40, 1994.

VINCENT, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific.

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 rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, p. 2096-2104, 1998.

VINUESA, P., SILVA, C., WERNER, D. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular

systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* 34, 29–54.

VINUESA P, LEON-BARRIOS M, SILVA C, WILLEMS A, JARABO-LORENZO A, PEREZ GALDONA R, WERNER D, MARTINEZ-ROMERO E.

*Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55:569-575.

WANG, E. T., VAN BERKUM, P., SUI, X. H., BEYENE, D., CHEN, W. X. & MARTINEZ-ROMERO, E. (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 51–65.

WANG, F. Q., WANG, E. T., ZHANG, Y. F. & CHEN, W. X. (2006). Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. *Syst Appl Microbiol* 29, 502–517.

WANG, Y. C., WANG, F., HOU, B. C., WANG, E. T., CHEN, W. F., SUI, X. H., CHEN, W. X., LI, Y. and ZHANG, Y. B. 2013. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36, 467-473.

WAYNE, L. G., BRENNER, D. J., COLWELL, R. R., GRIMONT, P. A. D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M. I., MOORE, L. H., MOORE, W. E. C., MURRAY, R. G. E. & OTHER AUTHORS (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463–464.

WEI, G.H.; ZHANG, Z.X.; CHEN, C.; CHEN, W.M. & JU, W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiol. Res.*, 163:651-662, 2008.

WILLEMS, A., COOPMAN, R. & GILLIS, M. (2001b). Comparison of sequence analysis of 16S–23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA–DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 623–632.

WILLEMS A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3–14.

WOESE, C. R. 1992. Prokaryote systematics: The evolution of a science. Pages 3-18 in: *The Prokaryotes*. A. Balows, ed. Springer-Verlag, Berlin.

WOLDE-MESKEL, E., TEREFEWORK, Z., FROSTEGARD, A. & LINDSTROM, K. (2005). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1439–1452.

XU LM, GE C, CUI Z, LI, FAN H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995;45:706-711.

YANNI, Y.G.; RIZK, Y.; ABD-EL, F.F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; RADEMAKER, J.; MAYA, J.F.; OSTROM, P.; VEJA, H.M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ, E.M.; MATEOS, P.; VELAZQUEZ, E.; WOPEREIS, J.; TRIPLETT, E.; UMALI, G.M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K. & DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28:845-870, 2001.

YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile Delta. *Plant and Soil*, v.336. p.129-142, 2010.

YAO ZY, KAN FL, WANG ET, WEI GH, CHEN WX. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2002;52:2219-2230.

YAO, Y., SUI, X. H., ZHANG, X. X., WANG, E. T. and CHEN, W. X. 2015. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1831-1837.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. & EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.*, 73:2271-2277, 1991.

YOUNG J M 2004 Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 149

ZAAT S. A., SCHRIPSEMA J., WIJFFELMAN C. A., VAN BRUSSEL A. A., LUGTENBERG B. J. (1989). Analysis of the major inducers of the *Rhizobium* *nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes. *Plant Mol. Biol.* 13 175–188.

ZAHIR, Z.A., M. ARSHAD AND W.T. FRANKENBERGER, JR. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.*, 81: 96-168.

ZHANG, X., SUN, L., MA, X., SUI, X. H. & JIANG, R. (2011). *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2425–2429

ZHANG, Y. J., ZHENG, W. T., EVERALL, I., YOUNG, J. P., ZHANG, X. X., TIAN, C. F., SUI, X. H., WANG, E. T. and CHEN, W. X. 2015. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2960-2967.

ZHANG, X. X., GAO, J. S., CAO, Y. H., SHEIRDIL, R. A., WANG, X. C. and ZHANG, L. 2015. *Rhizobium oryzicola* sp. nov., potential plant-growth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 2931-2936.

ZHENG W.T., LI Y., WANG R., SUI X.H., ZHANG X.X., ZHANG (J.J.), WANG (E.T.) and CHEN (W.X.): *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, 63, 2002-2007.

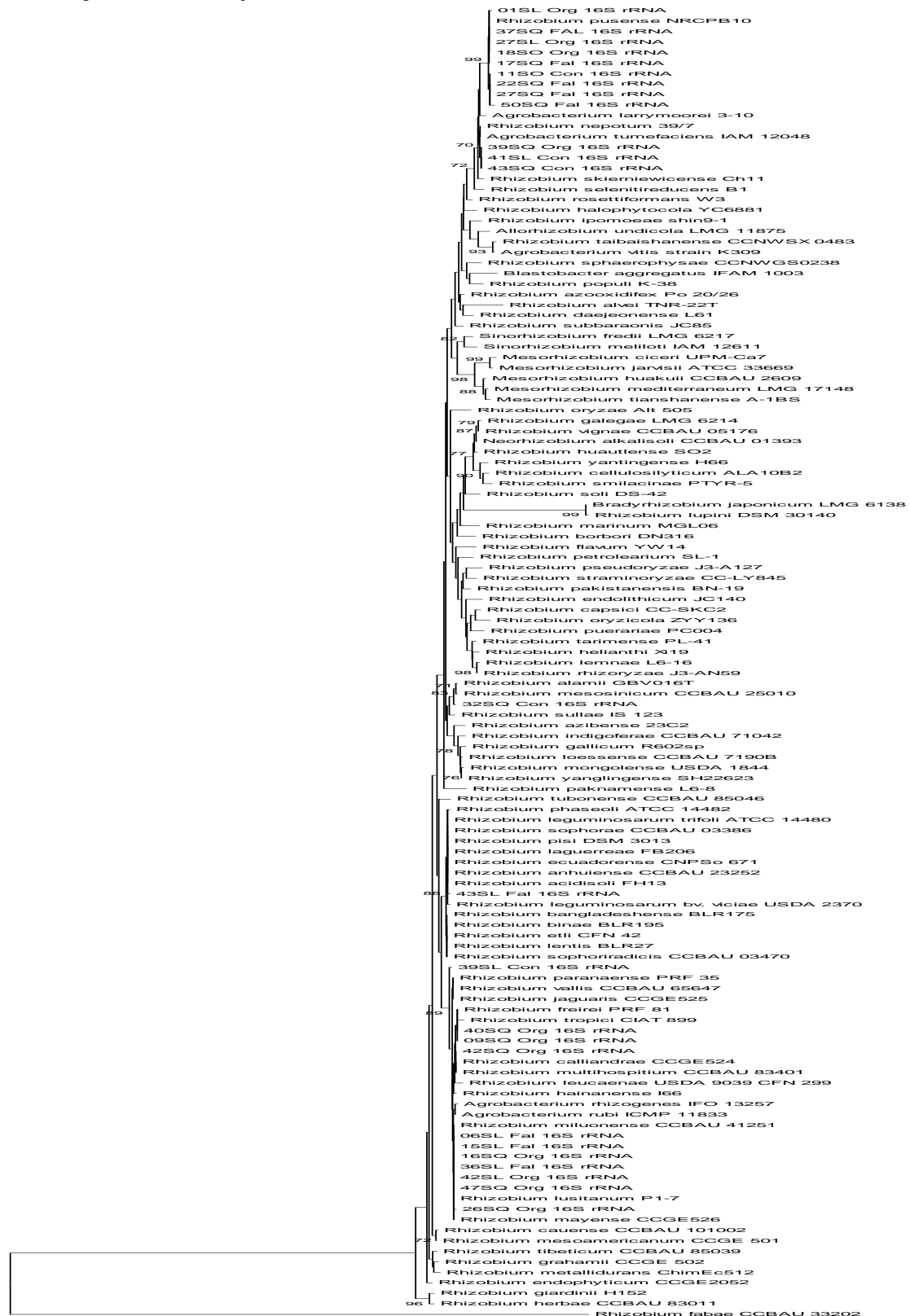
ZHOU (P.F.), CHEN (W.M.) and WEI (G.H.): *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60, 2552-2556.

ZOU L, CHEN YX, PENTTINEN P, LAN Q, WANG K, LIU M, et al. (2016) Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Nodulating Rhizobia Isolated from Root Nodules of Faba Bean in One Field. *PLoS ONE* 11(12): e0167804. doi:10.1371/journal.pone.0167804.

ZULUAGA, Monica Yorlady Alzate. Caracterização bioquímica e molecular de bactérias diazotróficas isoladas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*): influência do efeito rizosfera. 2016. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

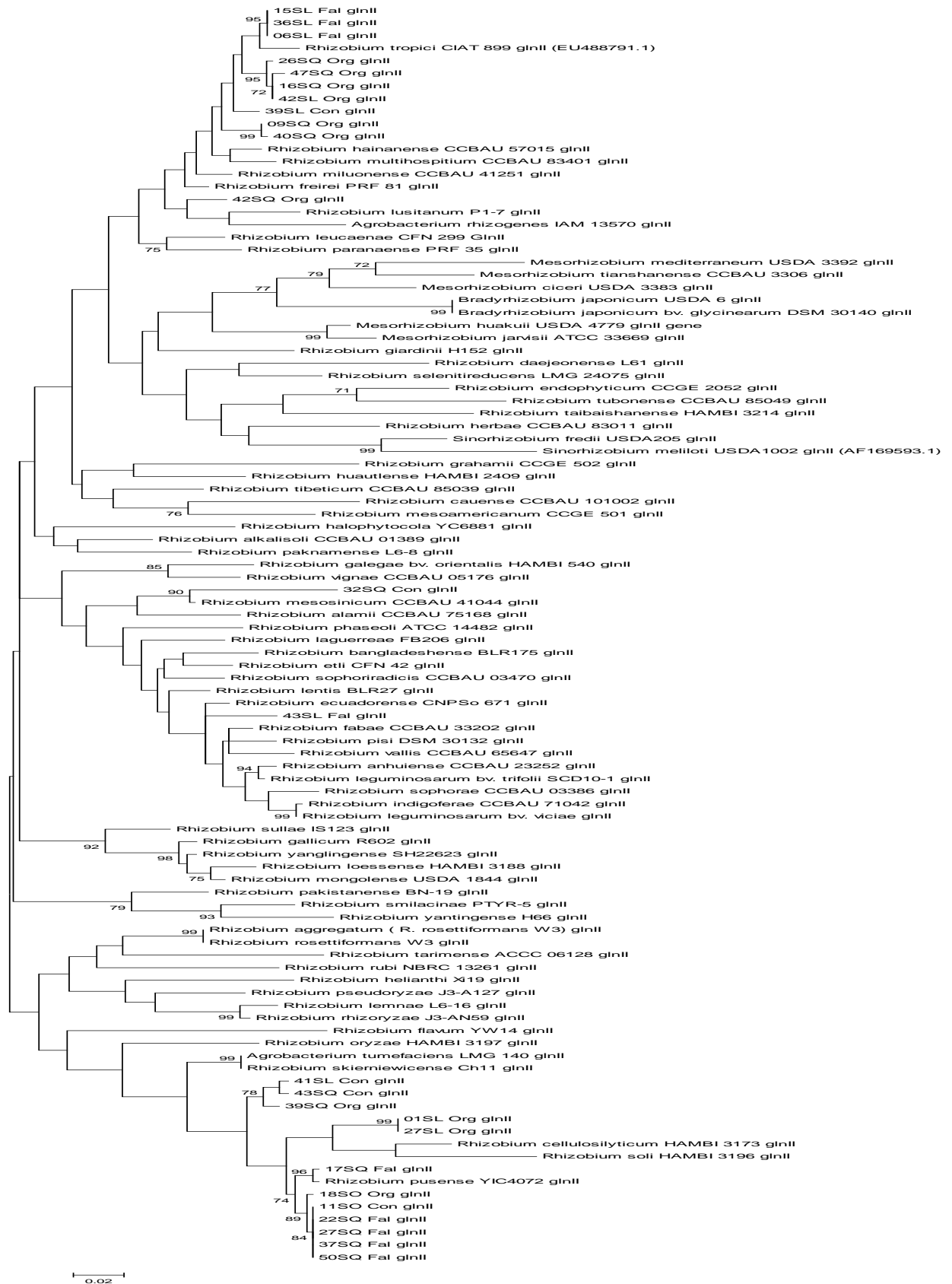
**ANEXOS**

Anexo A - A árvore filogenética com todas as estirpes do gênero *Rhizobium*, obtidas no banco de dados List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN; <http://www.bacterio.net>), baseada apenas no gene 16S rRNA, construída por meio do programa MEGA 7 e analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo Maximum Likelihood com suporte estatístico baseado na análise bootstrap de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.



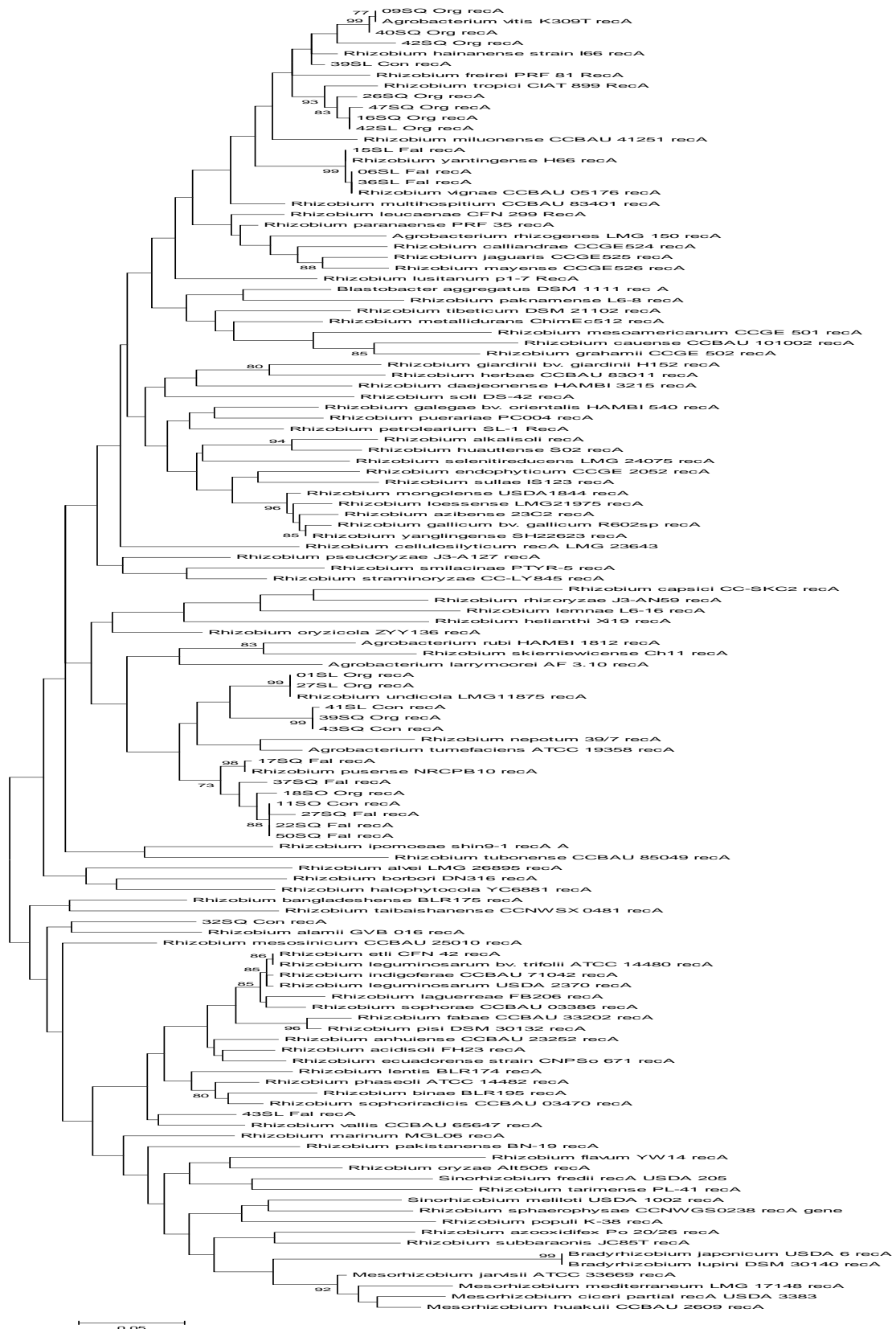
Fonte: Autor

**Anexo B** - A árvore filogenética baseada no gene *glnII* com todas as estirpes do gênero *Rhizobium*, construída por meio do programa MEGA 7 e analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo *Maximum Likelihood* com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.



Fonte: Autor

**Anexo C** - A árvore filogenética baseada no gene *recA* com todas as estirpes do gênero *Rhizobium*, construída por meio do programa MEGA 7 e analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo *Maximum Likelihood* com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.



Fonte: Autor

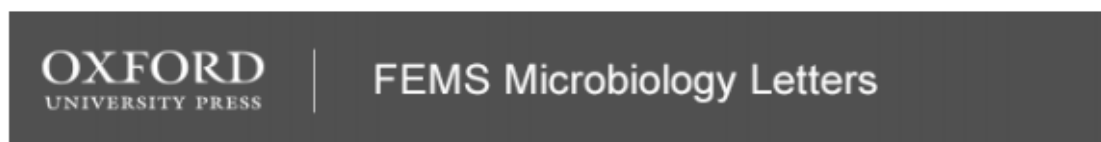
**Anexo D** - A árvore filogenética baseada no gene *rpoA* com todas as estirpes do gênero *Rhizobium*, construída por meio do programa MEGA 7 e analisada segundo o modelo distancia K2P e algoritmo *Maximum Likelihood* com suporte estatístico baseado na análise *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.



Fonte: Autor

## Anexo E - Registro de submissão do manuscrito.

FEMS Microbiology Letters



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

**Genetic diversity and phylogenetic positioning of rhizobia isolated from *Solanum lycopersicum* and *Solanum quitoense* grown in soils under different land use**

Journal:	<i>FEMS Microbiology Letters</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oliveira, André Luiz; Universidade Estadual de Londrina, Bioquímica Moriwaki, Marcel; Universidade Estadual de Londrina, Bioquímica Rorigues, Elisete; Universidade Estadual de Londrina, Biologia Geral Hungria, Mariangela; Embrapa Soja, Londrina, PR
Keywords:	MLSA, non-leguminous plants, phylogenetic relationships, Rhizobium
Please select the most appropriate subject section for your submission from the drop down list. For full Section descriptions please refer to the Author guidelines at <a href="https://academic.oup.com/femsle/pages/instructions_for_authors">https://academic.oup.com/femsle/pages/instructions_for_authors</a> :	Environmental Microbiology (Editor: Tim Daniell)

SCHOLARONE™  
Manuscripts