



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TALITA BUSULINI MARTINS

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE RIZÓBIOS: ENRIQUECENDO
O CONHECIMENTO SOBRE BIODIVERSIDADE DE
SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Londrina
2015

TALITA BUSULINI MARTINS

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE RIZÓBIOS: ENRIQUECENDO
O CONHECIMENTO SOBRE BIODIVERSIDADE DE
SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2015

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

Martins, Talita Busulini.

Taxonomia e filogenia de rizóbios : enriquecendo o conhecimento sobre biodiversidade de simbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Talita Busulini Martins. - Londrina, 2015.

92 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria da Cunha.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola - Tese. 2. Rizóbio - Tese. 3. Genética microbiana - Tese. 4. Feijão comum - Tese. I. Cunha, Mariangela Hungria da . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

TALITA BUSULINI MARTINS

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE RIZÓBIOS: ENRIQUECENDO O
CONHECIMENTO SOBRE BIODIVERSIDADE DE SIMBIONTES DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

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

Orientadora: Profa. Dra Mariangela Hungria da
Cunha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Renan Augusto Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

Dr. Douglas Fabiano Gomes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Soja

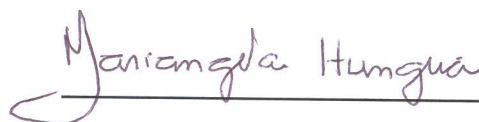
Londrina, 15 de Maio de 2015.

TALITA BUSULINI MARTINS

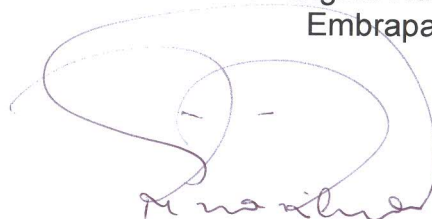
**TAXONOMIA E FILOGENIA DE RIZÓBIOS:
ENRIQUECENDO O CONHECIMENTO SOBRE
BIODIVERSIDADE DE SIMBIONTES DO FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

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.

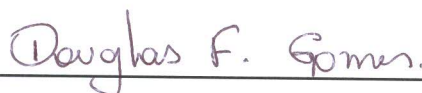
BANCA EXAMINADORA



Dr^a Mariangela Hungria da Cunha
Embrapa Soja



Dr. Renan Augusto Ribeiro
Embrapa Soja



Dr. Douglas Fabiano Gomes
Embrapa Soja

Londrina, ____ de ____ de ____.

MARTINS, Talita Busulini. **Taxonomia e filogenia de rizóbios:** enriquecendo o conhecimento sobre biodiversidade de simbioses do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em diversas regiões do Brasil, destacando-se como um dos principais constituintes da dieta dos brasileiros. Uma das principais características dessa leguminosa é a promiscuidade em associar-se simbioticamente com diferentes bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, as quais podem suprir sua demanda por esse nutriente. Em um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa foi identificado um grupo de estirpes denominado PEL 4, provenientes do centro de origem/diversificação do feijoeiro no Equador e no México e com propriedades distintas das espécies de rizóbios já descritas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e classificar as estirpes desse grupo PEL 4 (CNPSO 659, 670, 671, 672, 676, 683), através de uma análise taxonômica polifásica. Em geral, as estirpes pertencentes ao grupo PEL 4 apresentaram propriedades morfofisiológicas semelhantes às espécies geneticamente relacionadas *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* e *R. fabae*. Entre essas características estão a baixa tolerância ao pH ácido (pH 4,0), à alta salinidade (1% NaCl) e às temperaturas elevadas (37 e 40°C), distinguindo as estirpes do grupo PEL4 das espécies microssimbiontes do feijoeiro dominantes em solos ácidos, *R. tropici* e *R. leucaenae*. Na análise do perfil de DNA por BOX-PCR, as estirpes do grupo PEL 4 foram agrupadas com um elevado grau de similaridade (87,6%) e o agrupamento com as estirpes geneticamente relacionadas utilizadas como referência apresentou uma similaridade final de 68%. Tanto na análise do gene 16S rRNA, como de três genes *housekeeping* (*glnII*, *gyrB* e *recA*) verificou-se que as estirpes PEL 4 formaram um grupo com alto suporte de *bootstrap* e distinto das demais espécies de *Rhizobium* utilizadas na comparação. Na análise de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) com os três genes *housekeeping* concatenados as estirpes do grupo PEL 4 formaram um único grupo distinto das demais espécies geneticamente relacionadas, um forte indicativo de que compõem uma nova espécie de *Rhizobium*.

Palavras-chave: MLSA. *Housekeeping*. Rizóbios.

MARTINS, Talita Busulini. **Taxonomy and phylogeny of rhizobia:** enriching the knowledge about the diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbionts. 2015. 92p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is grown in several regions of Brazil, standing out as one of the main constituents of the diet of the Brazilian people. One of the main features of this legume is its promiscuity in associating symbiotically with different nitrogen-fixing bacteria, meeting the demand of the plants for this nutrient. In a previous study, our research group identified a group of strains called PEL 4, isolated from the center of common bean origin/diversification in Ecuador and Mexico and with distinct properties from the species of rhizobia already described. The aim of this study was to characterize and classify strains of this group PEL 4 (CNPSO 659, 670, 671, 672, 676, 683), through a polyphasic approach. In general, strains belonging to the PEL 4 group showed morphological and physiological properties similar to those of genetically related *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* and *R. fabae*. Among these properties are the tolerance to low acidity (pH 4.0), high salinity (NaCl 1%) and high temperatures (37 to 40°C), differentiating the strains of the PEL4 group from the common bean symbiotic species dominant in acidic soils, *R. tropici* and *R. leucaenae*. In the analysis of the DNA profiles by BOX-PCR the PEL 4 strains were grouped with high similarity (87.6%), and clustering with reference strains genetically related resulted in a final similarity of 68%. In the analysis of the 16S rRNA gene and of three housekeeping genes (*glnII*, *gyrB* and *recA*) the PEL 4 strains formed a group with high bootstrap support and distinct from other species of *Rhizobium* used as comparison. In the MLSA (Multilocus Sequence Analysis) analysis with three concatenated housekeeping genes the PEL 4 strains were also grouped and were positioned in a different group from the genetically related species, a strong indicative that they may compose a new *Rhizobium* species.

Keywords: MLSA. *Housekeeping*. Rhizobia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do processo de nodulação de plantas leguminosas	10
Figura 2 - Nódulo infectado por <i>Rhizobium</i> em corte transversal, demonstrando a cor vermelha característica.	11
Figura 3 - Resultado da análise em meio YM enriquecido com ureia após 3 dias da incubação	41
Figura 4 - Dendograma baseado nos perfis de DNA amplificados pela metodologia de BOX-PCR.....	49
Figura 5 - Árvore filogenética das estirpes do grupo PEL 4 e outras espécies de referência, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S.....	51
Figura 6 - Árvores filogenéticas das estirpes do grupo PEL 4 e outras espécies de rizóbios, baseadas no sequenciamento dos genes <i>housekeeping glnII</i> (A), <i>gyrB</i> (B), <i>recA</i> (C), analisados separadamente	58
Figura 7 - Árvore filogenética do grupo PEL 4, baseada no sequenciamento dos genes <i>housekeeping glnII</i> , <i>gyrB</i> e <i>recA</i> , analisados em conjunto (concatenados)	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estirpes de <i>Rhizobium</i> isolados de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) utilizados neste estudo.....	27
Tabela 2 - Estirpes de <i>Rhizobium</i> geneticamente relacionadas utilizadas como referência	28
Tabela 3 - Determinação da tolerância de procariotos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição.....	34
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e genes <i>housekeeping</i>	36
Tabela 5 - <i>Primers</i> e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S rRNA	37
Tabela 6 - Propriedades morfológicas das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas	40
Tabela 7 - Diferenças morfológicas das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas utilizadas nesse estudo	43
Tabela 8 - Diferenças entre as estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas quanto à utilização de fontes de carbono avaliadas por API 50CH kit.....	46
Tabela 9 - Tolerância das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas a diferentes antibióticos	48
Tabela 10 - Números de acesso do <i>GenBank</i> para as sequências utilizadas neste estudo.....	53
Tabela 11 - Variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes analisadas desse estudo com as estirpes geneticamente relacionadas de <i>Rhizobium</i> nos genes 16S rRNA, <i>glnII</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> e concatenados.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
2.1	O FEIJOEIRO	4
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	5
2.2.1	Bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio e o processo de nodulação	7
2.3	TAXONOMIA DE RIZÓBIOS	11
2.3.1	Princípios da taxonomia de bactérias	14
2.3.2	Caracterização fenotípica	15
2.3.3	Caraterização Genotípica	17
2.3.4	Caracterização Filogenética	18
2.4	FERRAMENTAS ATUAIS DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA DE PROCARIOTOS	19
2.4.1	Gene ribossomal 16S rRNA	19
2.4.2	Hibridação DNA-DNA	20
2.4.3	MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)	21
2.4.4	BOX-PCR	23
2.4.5	Outras análises baseadas na PCR.....	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ESTIRPES UTILIZADAS E CONDIÇÕES DE CULTURA	26
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	28
4.2.1	Taxa de Crescimento	28
4.2.2	Diâmetro das colônias	29
4.2.3	Alteração do pH (Reação Ácida/Básica)	29
4.2.4	Forma das colônias	29

4.2.5	Elevação das colônias	30
4.2.6	Borda das colônias.....	30
4.2.7	Superfície das colônias	30
4.2.8	Produção de muco	30
4.2.9	Consistência da massa de crescimento.....	30
4.2.10	Detalhes ópticos.....	31
4.2.11	Cromogênese.....	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA.....	32
4.3.1	Crescimento em diferentes meios de cultura, condições de pH, temperatura e salinidade.....	32
4.3.2	Utilização de fontes de C	32
4.3.3	Tolerância a antibióticos	33
4.4	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	34
4.4.1	Extração de DNA	34
4.4.2	Amplificação por PCR e purificação do gene 16S rRNA e genes selecionados para a análise de <i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA)	34
4.4.3	Sequenciamento	37
4.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	38
4.6	Box-PCR.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	39
5.2	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA.....	40
5.2.1	Crescimento em diferentes meios de cultura, temperaturas, condições de pH e salinidade	41
5.2.2	Utilização de fontes de carbono.....	44
5.2.3	Tolerância a antibióticos	47
5.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	49
5.3.1	Box-PCR.....	49
5.3.2	16S rRNA	50
5.3.3	Genes <i>housekeeping</i> analisados separadamente (<i>glnII</i> , <i>gyrB</i> e <i>recA</i>)	54
5.3.4	<i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA)	59
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em diversas regiões do Brasil, destacando-se como um dos principais constituintes da dieta dos brasileiros. Essa leguminosa representa uma das mais importantes fontes proteicas, possuindo também um bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante (VELAZQUEZ; KLUSON; SCRÖDER, 1988). Para que haja uma crescente evolução na produtividade do feijoeiro, alguns fatores são essenciais, entre eles a disponibilidade de nitrogênio (N) e fósforo (P). As principais fontes pelas quais o feijoeiro pode obter o N são: (i) por meio da adubação com fertilizantes nitrogenados; (ii) do solo pela decomposição da matéria orgânica e (iii) pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (ARAUJO, 1994; HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997).

O nitrogênio (N) é um nutriente extremamente importante para as plantas, por ser indispensável para a produção de compostos essenciais e por estar diretamente relacionado com a constituição de sua matéria orgânica. Depois do carbono (C), do hidrogênio (H) e do oxigênio (O), o N é o elemento mais abundante da natureza, participando da composição de moléculas de ácidos nucleicos, hormônios, proteínas, clorofila, polissacarídeos, entre outros. Apesar da sua abundância na atmosfera em uma forma muito estável, o nitrogênio (N₂) (78%), constitui um dos principais fatores limitantes para agricultura, pois nenhum ser vivo é capaz de assimilar o N₂ diretamente da atmosfera, devido à forte ligação existente entre os dois átomos de N, uma das mais fortes encontradas na natureza (HUNGRIA et al., 1994).

A maioria das plantas obtém o nitrogênio no solo sob a forma de íon nitrato (NO₃⁻), havendo algumas que o absorvem sob a forma de íon amônio (NH₄⁺) (ALFAIA, 2006). O nitrogênio atmosférico é convertido em formas assimiláveis pelas plantas e trazido para os solos através dos processos de fixação não-biológica, decorrentes de descargas elétricas (promovem a oxidação do N₂ em NO₃⁻), combustão e vulcanismo (liberação de NH₃), ou por fertilizantes nitrogenados (que possuem muitas desvantagens),

esses processos independem da ação de microrganismos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Outro aporte ocorre pelo processo biológico, a fixação biológica do nitrogênio (FBN), de grande importância econômica e agrônômica, que é realizada por alguns microrganismos que habitam principalmente o solo, como os rizóbios (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Os rizóbios possuem genes de nodulação que possibilitam a infecção dos pelos radiculares de espécies de leguminosas, resultando na formação de estruturas típicas, denominadas de nódulos. Essa associação entre planta e bactéria é tida como simbiótica, onde o rizóbio fornece à planta o nitrogênio proveniente da fixação biológica e a planta fornece à bactéria fontes de carbono provenientes da fotossíntese, sendo um processo que vem ocorrendo há milhões de anos (MENNA et al., 2006; RODIÑO et al., 2011).

Atualmente, as bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio são classificadas, com base na análise polifásica, incluindo características fenotípicas e genéticas, nos gêneros: *Allorhizobium* (= *Rhizobium*), *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Neorhizobium* (JORDAN, 1982; DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988; DE LAJUDIE et al., 1998; CHEN et al., 2001; GILLIS et al., 2001; MOUSAVI et al., 2014). Outros gêneros recentemente descritos como simbiontes e fixadores de nitrogênio são *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*. Além disso, há bactérias classificadas como betaproteobacteria dos gêneros: *Burkholderia* e *Cupriavidus* (= *Ralstonia*), onde todas costumam ser denominadas coletivamente de rizóbios (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A partir da década de 1980, o uso de ferramentas de genética molecular como a hibridação DNA-DNA, o sequenciamento do gene 16S rRNA e as metodologias como *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), resultaram em consideráveis avanços e levaram à modificação e reorganização taxonômica dos gêneros existentes, além de possibilitar a descrição de novos gêneros (WILLEMS, 2006).

A metodologia de MLSA analisa, em conjunto, genes *housekeeping* que estão presentes em todas as linhagens representativas de um táxon em estudo (gênero ou família) e em única cópia, representando uma estratégia útil,

pois funciona como um tampão contra os efeitos da recombinação gênica e da transferência horizontal de genes. A metodologia tem-se mostrando cada vez mais aplicável aos estudos filogenéticos e uma prova disto é a sua utilização, nos últimos anos, na descrição de vários gêneros procarióticos (GEVERS et al., 2005).

Devido ao grande número de microrganismos que ainda não foram identificados e classificados, e ao crescente número de técnicas eficazes da biologia molecular, a biosistemática tem adquirido importância crescente para a caracterização bacteriana e tem permitido um grande progresso na taxonomia dos microrganismos, incluindo os rizóbios, possibilitando a identificação de possíveis novas espécies. O estudo da diversidade rizobiana é um recurso biológico valioso que permite, dentre outros a identificação de estirpes que possuem características interessantes para maximizar a produtividade agrícola (DAI; LIU; WANG, 2012).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de *Rhizobium* spp. microssimbiontes do feijoeiro identificadas como fortes candidatas a novas espécies.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O FEIJOEIRO

O feijoeiro é cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversos sistemas de produção e em todas as regiões do Brasil. Encontra-se entre os principais constituintes da dieta consumida pelos brasileiros, representando uma das mais importantes fontes de proteína vegetal. Possui também um baixo índice de gordura e um grande conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante, que podem reduzir a incidência de doenças para mais de 300 milhões de pessoas, especialmente na América Latina, Caribe e África, por isso é considerado de alta qualidade nutricional e funcional (VELAZQUEZ; KLUSON; SCRÖDER, 1988; COSTA et al., 2013).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, e a produção nacional na safra de 2012/2013 foi de 2.806.300 toneladas, com uma área plantada de 3.111.000 ha (CONAB, 2014), sendo que apenas uma pequena margem do feijão brasileiro é exportada (4,4 mil toneladas em 2013) (MAPA, 2014). O feijoeiro é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros, com os mais diversos níveis tecnológicos e sistemas de produção. Em 2013, os principais estados produtores de feijão foram o Paraná (691 mil t; 23,21%), Minas Gerais (565 mil t; 18,98%), Goiás (293 mil t; 9,86%), Mato Grosso (280 mil t; 9,43%) e Bahia (274 mil t; 9,21%), os quais juntos responderam por 70,69% da produção nacional (MAPA, 2014).

Dos fatores limitantes para o desenvolvimento do feijoeiro no país, devem-se destacar aqueles relacionados ao baixo nível tecnológicos empregado pelos produtores, o cultivo nos solos de baixa fertilidade e a baixa disponibilidade de N (CABALLERO et al., 1985; MERCANTE et al., 1999). A tecnologia indicada para o aumento da produtividade e que supre as exigências de N na planta é a adubação nitrogenada. Entretanto, o manejo adequado da adubação nitrogenada representa uma das principais dificuldades da cultura, uma vez que, sendo preciso aumentar as doses e a quantidade de aplicações,

aumenta-se também o custo econômico, além da geração de custos ecológicos adicionais (STRALIOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2002; SANTOS et al., 2003).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que o feijoeiro, sendo uma leguminosa, apresenta condições de se beneficiar da associação simbiótica com *Rhizobium*, pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), podendo alcançar níveis de produtividade superiores a 2.500 kg/ha, onde a FBN assume um papel importante e de destaque, representando uma alternativa viável e eficaz no fornecimento de N à cultura (MERCANTE et al., 1999; HUNGRIA et al., 2000; STRALIOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2002; VALÉRIO et al., 2003; BARBOSA FILHO; FAGERIA; SILVA, 2005; BINOTTI et al., 2007; COSTA et al., 2013).

A utilização da FBN tem por objetivo aumentar a produtividade da cultura do feijoeiro, baixar os custos de produção e elevar a renda dos produtores através da adoção da prática de inoculação de sementes com estirpes de rizóbios eficientes (ZILLI et al., 2009).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é o quarto elemento mais abundante na natureza e é fundamental para o crescimento das plantas. Esse nutriente compõe a estrutura de diversas moléculas essenciais ao metabolismo célula, como os ácidos nucleicos, bases nitrogenadas, hormônios, clorofila, proteínas, entre outras moléculas de grande importância para a sobrevivência do organismo (SANTOS et al., 2008).

O nitrogênio encontra-se em abundância (78%) na atmosfera na forma de gás (N_2) e, apesar de estar presente em grande quantidade nessa forma, não apresenta uma fonte disponível para as plantas e organismos eucariotos, que são incapazes de absorver o gás nitrogênio e convertê-lo a uma forma assimilável. Essa incapacidade é devido a sua configuração molecular, pois esse elemento é constituído por dois átomos de N unidos por uma ligação

tripla, uma das mais fortes ligações encontradas na natureza (HUNGRIA et al., 1994; HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997).

As plantas podem obter o nitrogênio através dos seguintes meios: 1) a partir do solo, decorrente da decomposição da matéria orgânica (processo limitado, podendo ser esgotado rapidamente após alguns cultivos); 2) através de processos não-biológicos, como o uso de fertilizantes nitrogenados derivados de processos industriais (custo elevado e contaminação do meio ambiente); descargas elétricas que promovem a oxidação do N_2 em NO_3 ; combustão e vulcanismo (liberação de NH_3) e 3) pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) que se destaca como um dos processos mais importantes realizados pelos microrganismos do solo, responsável pela maior parte de N fixado no planeta (175×10^6 toneladas por ano). Esses microrganismos são os únicos organismos que conseguem converter o gás nitrogênio em formas utilizáveis (HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997; ZILLI et al., 1998; MARTÍNEZ-ROMERO; LLORET, 2005; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; REED; CLEVELAND; TOWNSEND; 2008).

A FBN é o processo realizado por alguns organismos procaríotos que possuem a habilidade de reduzir o N_2 atmosférico à amônia. Esses microrganismos são denominados diazotróficos e durante a evolução, adquiriram a capacidade de sintetizar um complexo enzimático, composto pela enzima nitrogenase, que é responsável pela fixação do nitrogênio (VARGAS; HUNGRIA, 1997). O complexo da nitrogenase é composto por duas proteínas diferentes, a dinitrogenase (Mo-Fe-proteína) e dinitrogenase-redutase (Fe-proteína) que catalisa a conversão de N_2 atmosférico à amônia. (HUNGRIA; CAMPO, 2005; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013).

A contribuição mais relevante da FBN na incorporação do N na biosfera é realizada por bactérias denominadas rizóbios. O nitrogênio assimilado por essas bactérias é fornecido para a planta em uma relação de simbiose, onde a planta fornece fontes de carbono (C) e energia necessárias para as atividades metabólicas da bactéria (INDGE, 2000). Essa colaboração planta-bactéria é tão íntima que se pode considerar a associação como uma nova forma de vida (SANTOS et al., 2008; LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998; INDGE, 2000).

Diversas leguminosas de grande importância agrícola fixam o nitrogênio através da simbiose com os rizóbios, por exemplo, o feijoeiro e a soja (*Glycine max* (L.) Merr.). A obtenção de N através da FBN é importante para a economia e ecologia, pois as leguminosas simbióticas podem colonizar ambientes pobres em nitrogênio, podendo enriquecer o solo reduzindo a demanda por fertilizantes químicos no âmbito agrícola, contribuindo para a diminuição de possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes insumos (ALLEN, ALLEN, 1981; LÓPEZ-GUERRERO et al., 2012). Estima-se que as leguminosas de importância agrícola fixem de 44 a 66.000.000 t de N₂ anualmente, com outros 3 a 5.000.000 t fixadas por leguminosas em ecossistemas naturais (GRAHAM; VANCE, 2003).

Comparando a entrada anual de N via FBN na Terra (65%) com a produção industrial de fertilizantes (24%) e a fixação não biológica (10%), tem-se a dimensão da importância desse processo biológico. Para a agricultura, a FBN tornou-se um fornecedor de nitrogênio com baixo custo econômico e impacto ambiental reduzido, pois o uso de estirpes eficientes em cultivares leguminosas possibilita a suplementação, ou até o não uso dos fertilizantes nitrogenados, demonstrando a importância de encontrar genótipos eficientes em fixar nitrogênio (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; PELEGRIN et al., 2009; MORAES et al., 2010).

2.2.1 Bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio e o processo de nodulação

Rizóbio é o nome genérico dado às bactérias que fazem parte de vários gêneros das classes alfa e betaproteobacteria. Essas bactérias são colonizadoras da rizosfera, mas podem se adaptar, a outros nichos, como sementes ou tecidos vegetais, nas raízes das plantas hospederias os rizóbios formam nódulos, onde fixam biologicamente o nitrogênio. Embora o principal tipo de associação dos rizóbios com as plantas seja simbiótico, também pode haver relações menos estreitas, sendo classificadas como associativas ou endofíticas (YANNI et al., 1997; PÉREZ-RAMÍREZ et al., 1998; CHAINTREUIL

et al., 2000; GUTIÉRREZ-ZAMORA, MARTÍNEZ-ROMERO, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSARD, 2006; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010).

As bactérias associativas interagem com as raízes e contribuem para o crescimento da planta sem invadir as células; as endofíticas são aquelas que, durante todo ou parte do seu ciclo de vida, invadem as células sem provocar danos para a planta; as simbióticas são as bactérias que induzem à formação de nódulos nas raízes, estabelecendo uma interação muito estreita entre o macro e o microssimbionte (EVANS; BURRIS, 1992; BODDEY et al., 2003; FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Esse grupo de microrganismos do solo é capaz de estabelecer simbiose com algumas leguminosas e fixar biologicamente o N₂, podendo estimular o crescimento das plantas, melhorando a fertilidade do solo e suas propriedades físicas (REIS et al., 2000; BASHAN; HOLGUIN; DE BASHAN, 2004; SALA et al., 2005).

As bactérias diazotróficas mais estudadas, pertencem às classes alfa Proteobactéria e beta Proteobactéria (ZAKHIA; LAUJUDIE, 2001) onde os gêneros mais conhecidos são: *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia* (= *Cupriavidus*), *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Aminobacter*, *Microvirga*, *Shinella*, e *Phyllobacterium* (POLHIL; RAVEN, 1981; ALLEN, ALLEN, 1981; HUNGRIA et al., 1994; ZAKHIA; LAUJUDIE, 2001; SANTOS; REIS, 2008; ESTRELLA et al., 2008; SHIRAISHI; MATSUSHITA; HOUGETSU, 2010; ARDLEY et al., 2012).

No solo, os rizóbios podem viver saprofiticamente e na presença da leguminosa hospedeira, a partir da liberação de sinais moleculares pelas raízes, uma série de respostas é desencadeada, dentre elas o deslocamento da bactéria por quimiotactismo positivo. Tais sinais são altamente específicos entre o hospedeiro e o simbionte (BAIS et al., 2004).

O processo de simbiose é iniciado quando os sinais moleculares, especialmente os flavonoides, são secretados pelo sistema radicular ativam o gene de nodulação *nodD*. O produto desse gene ativa a transcrição de outros genes de nodulação, *nod*, *nol* e *noe*, resultando na formação de moléculas denominadas como fatores Nod, responsáveis pelo início da nodulação e com

um papel também especificidade rizóbio – hospedeiro (RECOURT et al., 1989; GOORMACHTIG; CAPOEN; HOLSTERS, 2004).

Durante o processo de infecção de diversas leguminosas, como é o caso do feijoeiro, os rizóbios multiplicam-se ao redor dos pelos radiculares, induzindo ao enrolamento das células do pelo radicular. Esse enrolamento ocorre através da junção dos fatores Nod juntamente com uma série de hormônios, como auxinas e citocininas que são liberadas pelas bactérias, permanecendo envolvidos em um compartimento. Nesse compartimento, a parede celular começa a ser degradada em resposta ao fator Nod, permitindo que as células bacterianas acessem diretamente a superfície externa da membrana plasmática, originando o cordão de infecção, e resultando, finalmente, na entrada da bactéria pela raiz e o desenvolvimento dos nódulos (HUNGRIA et al., 1994; TAÍZ; ZIEGER, 2004; GOORMACHTIG; CAPOEN; HOLSTERS, 2004; SANTOS et al., 2008; MENNA-PEREIRA, 2008).

No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando, formando o nódulo primário, a partir do qual o nódulo irá se desenvolver (Figura 1). As bactérias, que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bacteroides (SANTOS et al., 2008).

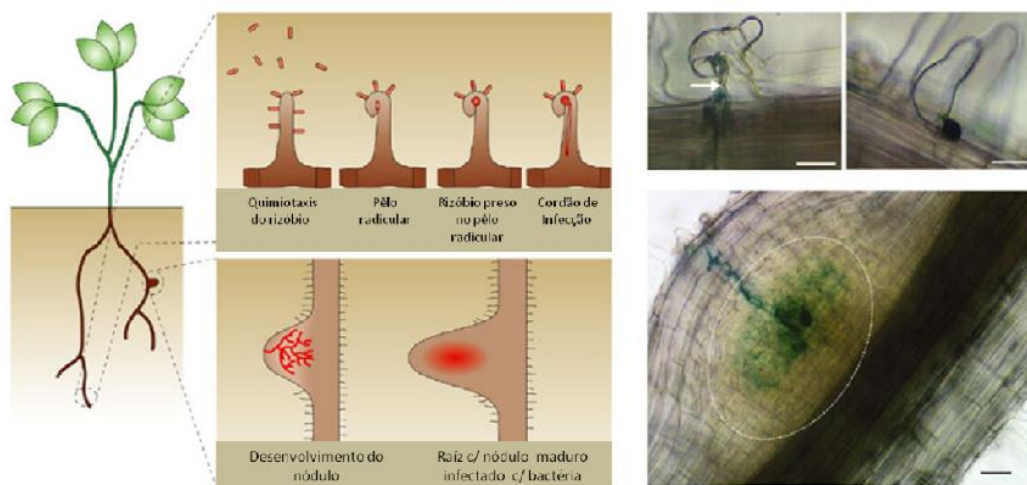


Figura 1. Fluxograma do processo de nodulação de plantas leguminosas. Fonte. http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n7/fig_tab/nrm1424_F1.html (OLDROYD, DOWNIE, 2004)

Com a formação dos nódulos, inicia-se o processo de fixação biológica do nitrogênio (ARGUDO et al., 2004). Os genes *nif* e *fix*, são os reguladores da FBN, atuando na síntese do complexo enzimático da nitrogenase, que opera como catalisadora da reação, sendo capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3) (HUNGRIA; STACEY, 1997).

A enzima nitrogenase é altamente conservada em termos de estrutura e função. Suas duas subunidades, uma denominada ferro proteína (liga-se ao ATP que atua como doadora de elétrons) e outra denominada molibdênio-ferro proteína (contém o sítio de redução do substrato que transforma o gás nitrogênio (N_2) em amônia (NH_3), que atua na formação do primeiro produto da fixação simbiótica do N_2 , a amônia (NH_3). A amônia (NH_3) é, então, imediatamente conduzida para fora do bacteroide, que em contato com o substrato aquoso do citoplasma das células, transforma-se, rapidamente, em íon amônio (NH_4^+) (CRAWFORD; GLASS, 1998; TAÍZ, ZIEGER, 2004; KING; PURCELL, 2005), formato que as plantas conseguem assimilar e utilizar o nitrogênio para o seu desenvolvimento.

Quando o processo de FBN está ativo, uma característica típica é a coloração interna vermelha dos nódulos (Figura 2), devido à atividade da leghemoglobina, indicando uma simbiose eficiente. A cor branca também pode aparecer nos nódulos completamente desenvolvidos, mas indica uma simbiose ineficiente, ocorrendo em algumas espécies não rizobianas, como *Phyllobacterium trifolii* (VALVERDE et al., 2005). As simbioses eficazes e ineficazes têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas, aumentando o número de *Rhizobium* isolados de nódulos de leguminosas que pertencem a diferentes classes e hospedeiros diferentes (STROSCHEIN, 2011).

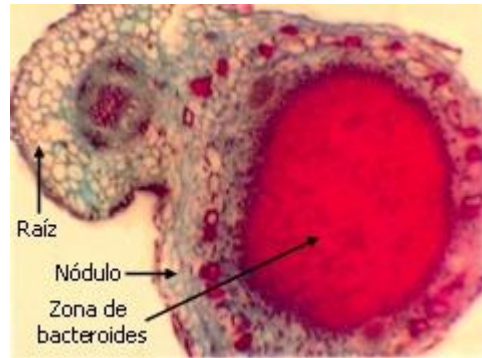


Figura 2. Nódulo infectado por *Rhizobium* em corte transversal, demonstrando a cor vermelha característica. Fonte. <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-10nodulos.htm>

Sabendo do grande potencial das bactérias fixadoras de nitrogênio para a agricultura e o meio ambiente, há um grande interesse em estudar a diversidade desses microrganismos, para que seu potencial seja mais bem explorado. O estudo da diversidade é de grande importância para o desenvolvimento da adaptação de novas espécies, podendo aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção, com o mínimo risco de degradação do solo e do ambiente. No entanto, há muitas leguminosas e ecossistemas que ainda não foram analisadas, fazendo com que cada ano, o número de espécies simbióticas aumente (GRANADA, 2010).

2.3 TAXONOMIA DE RIZÓBIOS

A classificação dos rizóbios passou por diversas alterações nos últimos vinte anos principalmente pelos avanços nas metodologias empregadas nos estudos, permitindo grandes avanços no conhecimento sobre a evolução e a taxonomia (WANG et al., 2006).

Nos estudos taxonômicos iniciais, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram classificadas como pertencentes a um único gênero, *Rhizobium*. Os testes realizados para essa classificação eram baseados em inoculação cruzada, sendo que o círculo de hospedeiros era o fator mais importante na definição destas espécies. Características morfológicas e fisiológicas também eram descritas nessa época e, com o

avanço das pesquisas, esse modo de classificação foi abandonado, por não apresentar alta confiabilidade na formação dos grupos taxonômicos (WANG et al., 2006; LINDSTRÖM; ASERSE; MOUSAVI, 2015).

Essa classificação inicial distribuiu os *Rhizobium* em seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*. Com isso, surgiu a necessidade de uma caracterização mais abrangente. Jordan (1982), realizou diversas metodologias, definiu um novo gênero cuja principal característica diferencial era a taxa de crescimento. Houve, então a diferenciação entre os rizóbios de crescimento rápido (*Rhizobium*) daqueles de crescimento lento (*Bradyrhizobium*), fazendo com que a especificidade pelo hospedeiro e dados baseados somente na morfologia, perdessem gradualmente sua confiabilidade como critério taxonômico (JORDAN, 1982; SAOUDI, 2008). Com essas modificações várias estirpes foram reclassificadas como *Bradyrhizobium*, mas com uma única espécie descrita, *Bradyrhizobium japonicum* (WANG et al., 2006).

Ainda na década de 80, Jarvis e colaboradores (1986), através de uma nova e mais avançada tecnologia, utilizando técnicas da biologia molecular, conseguiram confirmar as diferenças filogenéticas entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Os rizóbios de crescimento rápido foram reclassificados (utilizando também métodos de nodulação pela planta hospedeira) em três espécies: *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. A espécie *R. leguminosarum* foi subdividida em três biovares, *viceae*, *trifolii* e *phaseoli*, pois elas pertencem ao mesmo grupo na taxonomia numérica e na hidridização DNA-DNA, mas corresponderam a diferentes grupos na nodulação cruzada, onde nodularam respectivamente ervilha (*Vicia sativa*), trevo (*Trifolium* spp.) e feijão (JARVIS; GILLIS; DE LEY, 1986; WANG et al., 2006). Somente na década de 90, Kuykendall e colaboradores sugeriram aos *Bradyrhizobium* a subdivisão em duas espécies, *B. japonicum* (estirpes do grupo I) e *B. elkanii* (estirpes do grupo II) (KUYKENDALL et al., 1992); as diferenças taxonômicas e filogenéticas entre as duas espécies foram compiladas por Vargas e Hungria (1997).

As técnicas moleculares tiveram um grande desenvolvimento e foram disponibilizadas para a caracterização de rizóbios, induzindo mudanças consideráveis no seu campo de aplicação e classificação. Em uma abordagem polifásica, várias técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento molecular foram incluídas e se tornaram essenciais para caracterizar as novas estirpes, onde os resultados precisam ter erros mínimos e nomenclatura confiável para a identificação (VANDAMME et al., 1996; BOUZAR; JONES, 2001).

Os maiores avanços nos estudos da taxonomia polifásica estão sendo obtidos pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial à região que codifica o gene 16S rRNA, que é considerado conservado entre as espécies, mas ao mesmo tempo variável e com uma quantidade de informações suficiente para revelar as relações filogenéticas entre elas (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991). Com isso, a taxonomia do grupo dos rizóbios vem sendo modificada, por exemplo, no gênero *Rhizobium*, onde os gêneros *Agrobacterium* e *Allorhizobium* foram reclassificados e hoje se encontram posicionados dentro do gênero *Rhizobium* (*Rhizobiaceae*) (YOUNG et al., 2001; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009; COSTECHAREYRE et al., 2010).

Atualmente os rizóbios estão classificados como: bactérias Gram-negativas, aeróbias, não esporuladas (ZEHR et al., 2003) pertencentes ao: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae. Até o momento, os rizóbios estão posicionados nos seguintes gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*ensifer*); existem, também, espécies do grupo dos rizóbios pertencentes a gêneros bem distintos, tais como *Burkholderia*, *Shinella*, *Microvirga*, *Cupriavidus*, *Neorhizobium* e *Aminobacter* (JORDAN, 1982; SLY, 1985; DREYFUS, GARCIA, GILLIS, 1988; NAKAGAWA, SAKANE, YOKOTA, 1996; JARVIS et al, 1997; CHEN et al., 2001; MOULIN et al., 2001, CHEN et

al., 2003; GARRITY et al, 2005; MANTELIN et al, 2006; YOUNG, 2010; 2013 LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2010; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013; STRAININFO, 2015). Nem todas as estirpes de cada gênero, porém, são fixadores de nitrogênio, particularmente os “não - rizóbios”.

Além da classificação atual dos rizóbios, outras bactérias capazes de formar nódulos em leguminosas vêm assumindo um papel que antes, durante a triagem de classificação dos rizóbios, era descartado. Foi relatado, no estudo de Pandya e colaboradores (2013), que outras bactérias endofíticas podem ser responsáveis pela nodulação (PANDYA; NARESH KUMAR; RAJKUMAR, 2013). Elas podem entrar no interior dos nódulos e serem encontradas em conjunto com os rizóbios. Um exemplo disso é relatado com a nodulação de *Robinia pseudoacacia* por uma estirpe de *Pseudomonas* (SHIRAISHI; MATSUSHITA; HOUGETSU, 2010) e de leguminosas como da tribo *Trifoliae* por uma estirpe de *Paenibacillus sepulcri* (LATIF et al., 2013). Os autores afirmaram que essas estirpes infectam seus hospedeiros e induzem a formação de nódulos. Contudo, os resultados de Shiraishi et al. (2010) e Latif et al. (2013) devem ser observados com prudência, pois precisam ser confirmados através de técnicas adequadas que confirmem de forma inequívoca.

De tudo apresentado, pode-se concluir que é fundamental manter-se atualizado na constante evolução taxonômica dos rizóbios pois, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritas ou reclassificadas (VANDAMME et al., 1996).

2.3.1 Princípios da taxonomia de bactérias

A ciência que estuda o arranjo das bactérias é conhecida como taxonomia ou sistemática bacteriana, que é definida como o processo de classificação da diversidade em uma forma ordenada, reconhecendo grupos de organismos similares em uma hierarquia, tradicionalmente dividida em: (1) classificação, (2) identificação e (3) nomenclatura dos organismos (VANDAMME et al., 1996; DELLAGLIO; FELIS; GERMOND, 2004).

- 1 A classificação é a estruturação do organismo, com base na sua semelhança ou parentesco evolutivo (similaridade);
- 2 A nomenclatura é uma parte da taxonomia que dá nome aos grupos, ou seja, é a identificação das unidades definidas dentro da classificação;
- 3 A identificação decide se um determinado organismo pertence a uma das unidades definidas na nomenclatura (determina a identidade de um isolado como membro, ou não, de uma unidade) (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005).

Atualmente, busca-se classificar e descrever espécies de uma maneira mais rigorosa, integrando vários níveis de informações, como dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos dos microrganismos em estudo. Desde 1970 (COLWELL, 1970) até os dias de hoje, essa forma de classificar os microrganismos é chamada de taxonomia polifásica, sendo uma técnica informativa, capaz de contribuir para a classificação taxonomica e novos isolados (VANDAMME et al., 1996; MOREIRA et al., 2010; DALL'AGNOL et al., 2013).

Com a taxonomia polifásica, tornou-se importante correlacionar as diferenças taxonômicas com as características fenotípicas, sendo essa a visão do Subcomitê de Taxonomia de *Rhizobium* (ELKAN, 1992). O subcomitê considera que a descrição de um novo gênero ou espécie deve ser baseada em organismos independentemente isolados, de regiões geográficas distintas, com a descrição da espécie publicada no International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM), e que a estirpe padrão seja depositada em uma coleção de culturas internacionalmente reconhecida, disponível a outros pesquisadores. Assim como em todos os outros campos da taxonomia bacteriana, a taxonomia do rizóbio foi altamente influenciada pelos novos conceitos taxonômicos e filogenéticos, principalmente com a substituição do critério de especificidade hospedeira por outros baseados neste conceito de taxonomia polifásica (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

2.3.2 Caracterização fenotípica

Os métodos fenotípicos são todos aqueles que não estão diretamente relacionados com a molécula de DNA, como dados morfológicos, fisiológicos, sorológicos e quimiotaxonômicos, os quais analisados individualmente são considerados irrelevantes como parâmetro de classificação, mas quando analisados em conjunto permitem a descrição de diferentes isolados (WAYNE et al., 1987; VANDAMME et al., 1996).

Nos testes morfológicos de uma bactéria são analisadas características celulares (MELLONI et al., 2006), incluindo dados como: forma, coloração, tamanho, coloração de Gram, tempo de crescimento, reação ácida ou básica, diâmetro e produção de muco (VANDAMME et al., 1996). Muitas destas características fenotípicas são estudadas não somente com o objetivo de caracterização, mas também de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema, como: capacidade de crescimento em diferentes pH, concentrações de sais, habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono, temperatura e antibiótico (VANDAMME et al., 1996). Além disso, no caso dos rizóbios, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que devem refletir a diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre espécies de rizóbio e as diferentes leguminosas (KUYKENDALL; ELKAN, 1976; BATZLI; GRAVES; VAN BERKUM, 1992).

Uma das desvantagens de utilizar o método fenotípico está em que o mesmo organismo pode expressar diferentes características fenotípicas em diferentes condições ambientais. Além disso, é preciso notar que características fenotípicas devem ser comparadas com outros dados encontrados para estirpes relacionadas. Os resultados desta análise entre os diferentes laboratórios também têm representado um problema, sendo necessário utilizar procedimentos muito bem padronizados durante a execução dos testes. No entanto, em termos taxonômicos, com a introdução dos métodos de taxonomia numérica, a análise desses dados tornou-se indispensável, pois ela permite o agrupamento de um grande número de isolados de características semelhantes (ON; HOLMES, 1991; STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

2.3.3 Caracterização Genotípica

Nos últimos anos os grandes avanços na taxonomia microbiana se devem ao desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, as quais têm permitido a identificação e classificação rápida dos microrganismos.

A caracterização genotípica envolve diversas técnicas, e como alternativa existem diversos métodos moleculares disponíveis baseados na manipulação do DNA ou RNA que podem ser extraídos de estirpes crescidas em meios de cultura ou até mesmo a partir de amostras do ambiente, destacando-se, entre essas, a análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e suas variações, RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RT-PCR (*reverse-transcription PCR*), Nested-PCR (*Nested polymerase chain reaction*), Rep-PCR (REP, ERIC, BOX), PCR em tempo real, a porcentagem de G+C, hibridação DNA-DNA, sequenciamento dos genes e sequenciamento de genomas (VANDAMME et al., 1996, REIS JR. et al., 2002; EÇA, 2004; ACOSTA et al. 2011, RIBEIRO et al, 2013).

Essas técnicas têm fornecido aos cientistas uma riqueza de informações, pois o desenvolvimento das abordagens moleculares levou à formação de diferentes tendências dentro da sistemática bacteriana, por exemplo, a elucidação de relações filogenéticas, estudos descritivos combinando informações filogenéticas e fenotípicas, estudos ecológicos com o objetivo de revelar espécies não cultiváveis de microrganismos, além de permitir a análise e a identificação de genes conservados, através de táxons, em uma quantidade enorme de bactérias (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; STACKEBRANDT et al., 2002).

Dessa maneira, o conhecimento genotípico microbiano é essencial para entender a relação entre o ambiente e o funcionamento da bactéria nesse ambiente, e isso pode ser possível com o avanço da biologia molecular e o uso dessas técnicas no estudo desses microrganismos, que permite conhecer sua diversidade e distribuição (CARVALHO; PARANHOS, 2010).

A classificação com base nas características genéticas é, sem dúvida, mais informativa do que os sistemas baseados em dados fenotípicos. Esse método domina os estudos taxômicos, além de permitir, com a análise das sequências de DNA, a comparação em um contexto evolutivo, onde as bactérias são diferenciadas através dos dados de sequências dos genes 16S rRNA (MAIDAK et al., 1994; VAN BERKUM; FUHRMANN, 2000).

2.3.4 Caracterização Filogenética

A molécula de DNA, dentro da filogenia, mostra a história evolutiva dos microrganismos. Ela permite comparações das sequências de DNA de diversos genes entre diferentes organismos, permitindo inferir relações entre os organismos que não poderiam ser obtidas somente pela observação morfológica (NCBI, 2014).

A análise filogenética (phylon significa "tribo" e genetikos significa 'genitivo') é considerada uma análise padrão na sistemática bacteriana. Filogenia é o estudo da história evolutiva das espécies, dos genes ou proteínas, através do alinhamento de sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas existentes entre os organismos (SLEATOR, 2011). Quando sequências de ácidos nucleicos ou proteínas encontradas em diferentes organismos são parecidas, é provável que estas tenham sido originadas de um ancestral comum, onde o alinhamento de sequências revela quais posições foram conservadas e quais diferem entre os descendentes de um mesmo ancestral. Quando duas sequências possuem uma relação evolutiva, elas podem ser denominadas sequências homólogas. Os genes evoluem através do acúmulo de mutações, e o número de diferenças entre eles pode indicar a quanto tempo estes divergiram de um ancestral comum. Portanto, comparando-se diferentes genomas, é possível derivar relações evolutivas entre eles (VIANEZ JÚNIOR, 2005).

Nessa abordagem, uma árvore filogenética é formada, pelo uso dos programas da bioinformática, sendo ela a base para a classificação das bactérias, onde a validação multidimensional é feita examinando-se as várias

características moleculares e fenotípicas dos organismos estudados (STACKEBRANDT et al., 2002).

2.4 FERRAMENTAS ATUAIS DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA DE PROCARIOTOS

2.4.1 Gene ribossomal 16S rRNA

Avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo alcançados pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial na região que codifica o gene 16S rRNA, por ser uma região conservada entre as bactérias e que, ao mesmo tempo, contém variações significativas dentro do gene, com a capacidade de mostrar as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WEISBURG et al., 1991, CHARGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009).

O gene 16S rRNA preenche vários requisitos que definem um marcador filogenético. Eles são considerados cronômetros moleculares e têm sido amplamente utilizados nos estudos de evolução e classificação de microrganismos, onde a avaliação da variabilidade genética e a posição filogenética de várias espécies foi definida utilizando somente as sequências desses genes (VIANEZ JUNIOR, 2005). Atualmente esse gene é considerado o mais adequado para estudos de diversidade, pois ele consegue inferir relações filogenéticas entre espécies de bactérias, utilizando como principal critério a homologia entre as sequências de 16S rRNA.

A sequência do 16S rRNA tem sido amplamente utilizada por possuir várias características relevantes entre os microrganismos: (1) os rRNA's estão presentes e possuem a mesma função entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo o gene que apresenta o maior grau de conservação existente; (2) possui baixa taxa de mutação durante a evolução; (3) o ribossomo possui papel fundamental na síntese proteica; (4) possui tamanho ideal na utilização através da técnica de PCR e sequenciamento; (5) a estrutura primária destas

moléculas possui sítios de evolução independentes, ou seja, contém regiões variáveis para permitir a discriminação entre diferentes moléculas; (6) a molécula do 16S rRNA possuem tamanho suficiente e contém sequências informativas que permitem comparações estatísticas. Outra vantagem da utilização desse gene é que um grande número de sequências estão disponíveis via base de dados pela internet, permitindo o alinhamento de sequências e a identificação das regiões distintas (LANE et al., 1985; WOESE, 1987; VAN BERKUN et al., 2000; CLARRIDGE, 2004; STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014).

Embora os genes ribossomais, particularmente o 16S rRNA sejam as moléculas mais utilizadas para estimar as relações filogenéticas entre as bactérias, pela definição atual de taxonomia, a sequência completa do gene ribossomal 16S permite classificar procariotos somente até nível o de gênero. Isso porque a magnitude da divergência da sequência do gene 16S rRNA é limitada e insuficiente para distinguir, claramente, em diversos gêneros as espécies que estão estreitamente relacionadas, onde a divergência é muito recente (GARRITY, HOLT, 2001; COENYE; VANDAMME, 2003; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014).

2.4.2 Hibridação DNA-DNA

A Hibridação DNA-DNA (HDD) desempenha um papel-chave na taxonomia polifásica. Essa técnica é baseada nas propriedades físico-químicas do DNA, sendo utilizada para a caracterização genotípica. A hibridação DNA-DNA é necessária para classificar novas espécies que apresentam elevada similaridade nas sequências do gene 16S rRNA, sendo fundamental para o estabelecimento da taxonomia de diferentes grupos taxonômicos e, até o presente momento, continua sendo uma metodologia empregada para a definição de novas espécies (VANDAMME et al., 1996; STACKEBRANDT et al, 2002, GEVERS et al., 2005; TINDALL et al., 2010).

Hoje em dia os estudos evolucionários e taxonômicos são definidos e classificados através da espécie que possua menos do que 97% de homologia,

ou seja, elevada similaridade, no gene 16S rRNA e que possua hibridação DNA-DNA 70% ou mais de similaridade com a estirpe-tipo, ou 5°C, ou menos, de ΔT_m (diferença na temperatura de determinação) (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005; COENYE et al., 2005). Quando o percentual de recombinação DNA-DNA é igual ou superior a 70% sugere-se que pertence à mesma espécie, sendo que as espécies que encontram-se nas faixas de 25 e 60% são consideradas diferentes, mas pertencentes ao mesmo gênero (WANG et al., 2006).

Como todos os métodos, a hibridação DNA-DNA apresenta algumas limitações, tais como: variações nos valores quando reproduzida em diferentes laboratórios; permite o estudo de poucos grupos; constitui um procedimento extremamente laborioso e de alto custo; não tem a capacidade de gerar bancos de dados; dificulta a identificação dos microrganismos, sendo incapaz de identificar bactérias não cultiváveis (CROSA; BRENNER; FALKOW, 1973; VANDAMME et al., 1996; ROSSELLÓ-MORA, AMANN, 2001; GEVERS, et al., 2005; RAMOS et al., 2011). Ainda assim, a maior parte das espécies de rizóbios é definida por esse critério, utilizando como apoio dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos que podem auxiliar na correta descrição (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994; MAESTER et al., 2010).

2.4.3 MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS (MLSA)

O desafio em estudar a dispersão e classificação de microrganismos deriva da dificuldade de definir a origem das linhagens em comunidades microbianas (LITCHMAN, 2010). Frequentemente, a caracterização e a identificação das estirpes têm contado com a utilização do gene 16S rRNA, entretanto, a filogenia de um único gene pode não refletir a evolução do genoma como um todo, sendo o gene 16S rRNA pouco divergente entre as espécies. Estas observações sugerem que a filogenia com base em um único gene nem sempre reflete, com precisão a relação entre os grupos, sendo necessário adaptar uma abordagem mais ampla para a determinação das espécies (MARTENS et al. 2007; WEI et al., 2009; RODRÍGUEZ –

ECHEVERRÍ 2010; LIU et al., 2012; RODRÍGUEZ - ECHEVERRÍA et al., 2012).

Uma nova metodologia para estudos de taxonomia e filogenia de bactérias consiste na técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), que caracteriza-se por analisar sequências concatenadas de múltiplos genes ou a análise conjunta de, no mínimo, cinco genes conservados (*housekeeping*) (STRACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005). Essa metodologia foi utilizada com sucesso em estudos anteriores para elucidar as relações taxonômicas entre as espécies de *Bradyrhizobium* (RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009, DELAMUTA et al., 2013), *Ensifer* (MARTENS et al. 2007, 2008) e *Mesorhizobium* (TURNER et al. 2002; DEGEFU; WOLDE-MESKEL; FROSTEGÅRD, 2011), *Rhizobium* (RIBEIRO et al., 2009, 2012, 2013; ROMA-NETO; RIBEIRO; HUNGRIA, 2010; DALL'AGNOL et al., 2013, 2014).

Assim, analisando esses vários genes concatenados, pode-se observar que eles funcionam como um “tampão” contra os efeitos de recombinação genética ou transferência horizontal ocorridos em um único gene, além de esclarecer a distinção entre espécies altamente relacionadas (GEVERS et al., 2005; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009; DALL'AGNOL et al., 2013). Entre os vários genes com funções conservadas que vêm sendo utilizados em análises de MLSA estão: *glnII*, *glnA*, *gltA*, *recA*, *atpD*, *dnaK*, *rpoB*, *thrC*, *gyrB*, *gap*, *pnp*, *rpoB*, *dnaJ*, *rpoA* (TURNER; YOUNG, 2000; GAUNT et al., 2001; STEPKOWSKI et al., 2005; HERNÁNDEZ-LUCA et al., 2004; MARTENS et al., 2007, 2008; ALEXANDRE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009, 2012, 2013). Todos esses genes apresentam como vantagem uma taxa de evolução mais rápida do que os genes ribossomais, o que permite maior diferenciação dos grupos filogenéticos (GEVERS et al., 2005).

Segundo Zeigler (2003) e Thompson et al., (2005), cada gene utilizado como marcador filogenético alternativo precisa obedecer alguns critérios: 1) ser conservado para o grupo em estudo, sendo esse o principal dos critérios; 2) estar distribuído no genoma com uma distância mínima de 100 kb; 3) estar presente no genoma em uma única cópia; 4) ter número de nucleotídeos

suficiente para permitir o sequenciamento; 5) estar correlacionado com dados obtidos com o gene ribossomal 16S; 6) possuir, no mínimo, de três a cinco genes em estudo.

A metodologia de MLSA vem sendo preferencialmente escolhida pelos pesquisadores em estudos de diversidade por ser uma técnica de alta confiabilidade, permitindo a discriminação dos microrganismos em nível de espécie. Dessa forma essa abordagem vem sendo cada vez mais utilizada na elucidação de relações taxonômicas, onde inicialmente os microrganismos eram identificados somente em nível de gênero ou família com base no gene 16S rRNA (WERTZ et al., 2003; ADEKAMBI; DRANCOURT, 2004; CHRISTENSEN et al., 2004; HOLMES; NEVIN; LOVLEY, 2004; GEVERS et al., 2005; THOMPSON et al., 2005). Assim, utilizando o MLSA, novas espécies de rizóbios vêm sendo descritas, refletindo o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos de taxonomia e filogenia.

2.4.4 BOX-PCR

Diversos estudos de determinação das relações genéticas entre estirpes de rizóbio têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, como as sequências de BOX. O aprimoramento de metodologias baseadas em PCR possibilitou a inserção desta técnica para a identificação e tipificação de microrganismos (BOER; BEUMER, 1999; MARLONY et al., 2003).

As sequências de BOX codificam regiões altamente conservadas e repetidas, promovendo a chamada impressão digital do microrganismo (*fingerprinting*) ou seja, essa técnica é empregada para caracterização molecular de comunidades bacterianas, utilizando *primers* (chamados de primers “de consenso”) que anelam nas regiões dos elementos BOX do genoma, resultando em polimorfismo de bandas que permitem o estudo da diversidade de microrganismos relacionados e ecologicamente importantes (RADEMAKER; LOUWS; DE BRUIJN, 1998; VERSALOVIC et al., 1994; CHUEIRE et al., 2000).

Grandes avanços foram conquistados no campo da filogenia com a análise de BOX-PCR, pois essa metodologia é frequentemente utilizada na diferenciação de estirpes em estudos de diversidade. No caso dos rizóbios, essa ferramenta tem sido utilizada na caracterização da diversidade de bactérias proximamente relacionadas e na descrição de novas espécies (HAN et al., 2008; LU et al., 2009; KOEDOEBOEZ et al., 2009; MENNA et al., 2009, RIBEIRO et al., 2012; DELAMURA et al., 2013; DALL'AGNAL et al., 2013, 2014).

2.4.5 Outras análises baseadas na PCR

Existem outras técnicas que podem ser utilizadas para identificar e classificar bactérias, como a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), MLST (*Multilocus sequence typing*), FTI-R (*Fourier-Transform Infrared* - espectroscopia de infravermelho), DNA *microarrays*, MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*). Em estudos de taxonomia e diversidade de microrganismos, a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), polimorfismo dos espaçadores (IGS – *Intergene Sequences*) do DNA ribossômico, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), PCR-SSCP (*Single-Strand-Conformation Polymorphism*), PCR de sequências repetitivas de DNA (rep-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VERSALOVIC et al., 1994; VANDAMME, 1996; STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Uma outra metodologia utilizada na caracterização de novas espécies, consiste na análise do gene ribossomal 23S e regiões intergênicas (ITS1). As regiões intergênicas são conhecidas por sua variabilidade no tamanho e sequência. Essa análise (utilizadas em complementação ao 16S rRNA), se tornou um método útil para o estudo da diversidade entre as populações bacterianas e tem sido sugerido, no caso de espécies estreitamente

relacionadas, pois um nível maior de diferenciação pode ser obtido pela análise do espaço intergênico. Os resultados de alguns estudos apontam alta variabilidade na região ITS1, indicando utilidade para a diferenciação de estirpes de rizóbios, permitindo a discriminação de espécies que eram distintas mas relacionadas (DOIGNON-BOURCIER et al., 2000; VAN BERKUM; FUHRMANN, 2000; WILLEMS; COOPMAN; GILLIS, 2001; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003).

Como toda técnica, a metodologia que analisa as sequências ITS1 e 23S rRNA apresenta algumas limitações, como a ocorrência de transferência horizontal, parcial ou total dos operons, uma vez que muitos gêneros de bactérias contêm múltiplas cópias do operon ribossomal (16S, ITS, 23S e 5S), onde os alelos, em cada cópia, podem ser diferentes (TAN et al., 2001; WILLEMS et al., 2003).

Esses métodos permitem discriminar, inclusive, linhagens geneticamente relacionadas, tomando-se por base a variabilidade e o sequenciamento de bases dessas regiões gênicas, permitindo a definição precisa das espécies podendo, disponibilizar mais dados para os estudos filogenéticos (GARRITY; HOLT, 2001). Conhecer a estrutura genética das populações de bactérias é muito importante para melhor conhecer a dinâmica destas populações e poder selecionar estirpes com maior confiabilidade e eficiência em fixar nitrogênio biologicamente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de *Rhizobium* spp. microssimbiontes do feijoeiro identificadas como fortes candidatas a novas espécies.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Construir árvores filogenéticas individuais para cada um dos genes *housekeeping* (*glnII*, *gyrB* e *recA*) utilizados no presente estudo e compará-las à árvore construída com as sequências do gene ribossomal 16S.
- b) Caracterizar fisiologicamente as estirpes quanto à utilização de diferentes fontes de carbono, tolerância a antibióticos e outros parâmetros fenotípicos;
- c) Avaliar os perfis genéticos das estirpes por meio da técnica de BOX-PCR;
- d) Utilizar a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) para determinar a diversidade genética e relações filogenéticas;
- e) Realizar uma análise polifásica de todas as características avaliadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES UTILIZADAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Seis estirpes do gênero *Rhizobium* sp. foram utilizadas neste estudo, todas isoladas da mesma espécie de leguminosa, *Phaseolus vulgaris* L. Atualmente estão classificadas como *R. leguminosarum*, mas em um estudo prévio foram identificadas como potenciais novas espécies (RIBEIRO et al., 2013). Os exemplares correspondem às estirpes do grupo PEL 4 identificado por Ribeiro e colaboradores (2013), incluindo: *Rhizobium* sp. CNPSo 659,

CNPSo 683, CNPSo 670, CNPSo 671, CNPSo 672, CNPSo 676, cujas informações constam na Tabela 1.

Além do grupo PEL 4, cinco estirpes geneticamente relacionadas foram utilizadas como referência: *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T; *R. fabae* CCBAU 33202^T; *R. pisi* DSM 30132^T; *R. etli* CFN 42^T (= USDA 9032, = ATCC 51251, = DSM 11541); *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T (Tabela 2). As estirpes estão depositadas na “Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja” (WFCC Collection # 1213, WDCC Collection # 1054). No caso das análises filogenéticas, foram usadas também sequências de outras espécies.

Tabela 1. Estirpes de *Rhizobium* isoladas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas neste estudo.

Nº CNPSo	ESTIRPES UTILIZADAS	ESPÉCIE HOSPEDEIRA	REFERÊNCIAS	ORIGEM
672	<i>Rhizobium</i> sp. PEL 4			La Olivos/Imbaburra/Equador
670	<i>Rhizobium</i> sp. PEL 4	<i>(Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> L.)	(RIBEIRO et al., 2013)	San Jose/Imbaburra/Equador
671	<i>Rhizobium</i> sp. PEL 4			Pimampiro/Imbaburra/Equador
683	<i>Rhizobium</i> sp. PEL 4			Salapa/Loja/Equador
676	<i>Rhizobium</i> sp. PEL 4			Salsipuedes/Chimborazo/Equador
659	<i>Rhizobium</i> sp. PEL4			México

Tabela 2. Estirpes geneticamente relacionadas utilizadas como referência.

N° CNPSo	ESTIRPES DE REFERÊNCIA
2057	<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482 ^T
2059	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T
2058	<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T
664	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T
134	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T

O meio YMA (*Yeast Manitol Agar*, VINCENT, 1970) foi utilizado para o cultivo das bactérias. Para o estoque houve a adição de glicerol 30%, a -4°C para estocagens de curto prazo e a -80°C para estocagens de longo prazo, conforme descrito por Menna et al. (2006).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfológica das estirpes incluiu a avaliação da:

- Taxa de crescimento em meio YMA contendo vermelho Congo (VC) (rápida, intermediária, lenta ou muito lenta);
- Morfologia das colônias em relação à forma, bordas, superfície, produção de muco, elevação, consistência e detalhes ópticos;
- Mudança de coloração (reação ácido/básico) em meio YMA contendo o indicador azul de bromotimol (ABT);
- Cromogênese da cultura em meio YMA contendo ABT e VC, conforme descrito por Martínez-Romero et al. (1991) e Hungria et al. (2000).

4.2.1 Taxa de Crescimento

Para o crescimento das estirpes, foram utilizadas placas de Petri contendo meio YMA com indicador VC e avaliadas quanto à taxa de crescimento sendo necessárias três colônias isoladas para registrar a manifestação. As estirpes foram classificadas como sendo de crescimento rápido (até 3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 9 dias) ou muito lento (superior a 10 dias).

4.2.2 Diâmetro das colônias

O tamanho do diâmetro das colônias foi medido três dias após o registro da manifestação de crescimento das colônias isoladas com um paquímetro sob estereomicroscópio com luz incidente superior (média em milímetros (mm)).

4.2.3 Alteração do pH (Reação Ácida/Básica)

As estirpes foram crescidas em placas contendo meio YMA sólido com indicador azul de bromotimol, sendo que a mudança da coloração foi observada e registrada: azul indicou alcalinização do meio e o amarelo indicou acidificação do meio. Quando o meio permaneceu verde (coloração original), a reação foi considerada neutra.

4.2.4 Forma das colônias

A forma das colônias foi observada sob estereomicroscópio, com luz incidente superior e foram classificadas como circular, oval (elíptica) ou irregular.

4.2.5 Elevação das colônias

A elevação das colônias foi analisada observando-se a placa lateralmente e classificada como plana (crescimento rente à placa), ou convexa – *drop like* – (crescimento consideravelmente acima do meio de cultura).

4.2.6 Borda das colônias

A borda das colônias foi observada sob esteromicroscópio, com luz incidente superior e classificada como lisa, ondulada ou filamentosa.

4.2.7 Superfície das colônias

A superfície das colônias foi observada sob esteromicroscópio, com luz incidente superior, sendo classificada como lisa ou rugosa.

4.2.8 Produção de muco

A avaliação da produção de muco foi feita com base no tamanho da colônia, sendo classificadas como: pouca (colônias apresentam diâmetro $\leq 1,9$ mm), moderada (colônias apresentarem diâmetro entre 2 a 3,9 mm) e abundante (colônias apresentam diâmetro ≥ 4 mm). A medição foi realizada três dias após a manifestação de crescimento.

4.2.9 Consistência da massa de crescimento

A consistência das colônias foi analisada encostando-se uma alça de platina flambada e resfriada delicadamente sobre uma colônia isolada e seu aspecto foi observado sob esteromicroscópio, com luz incidente superior. As colônias foram classificadas em aquosas (desmancham-se totalmente quando

tocadas pela alça), secas (possuem pouca quantidade de muco), gomosas (podem ser arrastadas sobre o meio de cultura sem se desmanchar, deixando um pequeno rastro), e viscosas (possuem aspecto elástico e quando tocadas pela alça formam um fio bastante elástico entre a alça e a cultura).

4.2.10 Detalhes ópticos

As estirpes foram analisadas segundo seus detalhes ópticos, utilizando-se o fundo branco de um esteromicroscópio com luz incidente superior. Para esta análise, foi feito um risco com caneta de retroprojeter no fundo da placa, pelo lado de fora, exatamente abaixo do local onde a massa celular apresentou crescimento mais intenso. As colônias foram classificadas como transparentes (risco feito com a caneta aparece sob a massa celular), ou opacas (risco encontra-se pouco visível ou totalmente coberto pela massa celular).

4.2.11 Cromogênese

a) Meio YMA contendo Azul de Bromotimol (ABT)

As culturas foram crescidas em placas contendo meio YMA com ABT. A coloração da massa em crescimento foi classificada **como creme, amarela, rosa ou azul.**

b) Meio YMA contendo Vermelho Congo (VC)

As culturas foram crescidas em placas contendo meio YMA com VC. A coloração da massa em crescimento foi classificada como branca, rosada, avermelhada (centro) ou vermelha.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

4.3.1. Crescimento em diferentes meios de cultura, condições de pH, temperatura e salinidade.

As estirpes do estudo foram testadas em diferentes meios de cultura: LB (Luria Bertani) pH 7,5 [Tryptoma (10 g); Extrato de levedura (5 g); NaCl (5 g)], PY sem cálcio [Pepitona (5 g); Extrato de levedura (3 g)], e YM acrescido de Ureia (K_2HPO_4 (0,5 g); $MgSO_4$ (0,2 g); NaCl (0,1 g); Manitol (5g); Extrato de levedura (0,4 g); Agorose (12 g) e Corante vermelho de Fenol (0,012 g) Ureia (20g)). As estirpes também foram testadas quanto à tolerância ao cloreto de sódio, sendo o YM suplementado com 1% de NaCl. A inoculação para o crescimento em diferentes condições de pH foi avaliada em meio YM líquido com pH ideal 6,8 e pH 4,0. A capacidade de crescimento dos microrganismos em diferentes temperaturas foi avaliada em estufa com agitação a 28°C, 37°C e 40°C em meio YM líquido. O crescimento das estirpes (análises de pH e temperaturas diferentes), foi mensurado após três dias da incubação por densidade óptica (D.O.) a 600 nm. Todas as análises foram avaliadas após o terceiro dia de crescimento e em duplicata.

4.3.2 Utilização de fontes de C

As estirpes em estudo foram crescidas em meio YM e incubadas sob agitação a 120 rpm, por 48 horas. Cada cultura, após atingir o crescimento, foi centrifugada a 6.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL de solução salina a 0,85% e novamente centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, o pélete foi ressuspensado em 2 mL de água Milli-Q estéril. Em seguida, a solução foi transportada para um tubo de ensaio estéril e a concentração das células foi ajustada para, aproximadamente, 10^9 células/mL, através da escala de McFarland. O ajuste da concentração foi feito através da transferência, por um conta-gotas, desta

última solução para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água Milli-Q. Posteriormente, o inóculo foi transferido, através do mesmo conta-gotas, para um frasco de vidro contendo 10 mL de meio de cultura modificado (YM sem manitol, indicador azul de bromotimol) e testado em placas de API 50CH kit (BioMérieux), com 49 fontes de carbono. A quantidade de inóculo transferida corresponde à 2X o número de gotas utilizadas para se ajustar à concentração de células. A incubação na placa de API foi realizada a 28°C por 72 h. Cada bactéria foi analisada em duplicata.

4.3.3 Tolerância a antibióticos

As estirpes foram avaliadas quanto à sua tolerância a determinados antibióticos pelo método de Disco-Difusão (BAUER; KIRBY, 1966), o qual avalia a sensibilidade ou resistência da bactéria ao antimicrobiano pela medida direta do diâmetro do halo de inibição que se forma ao redor do disco. As culturas foram crescidas em meio YMA durante dois a três dias, sob agitação constante de 100 rpm. Após atingir o crescimento, 100 µL do pré-inóculo foram transferidos para uma placa de Petri contendo YMA sólido e dois discos de um mesmo antibiótico foram adicionados, sendo feita uma placa para cada antibiótico. Após três dias de crescimento, o halo de inibição foi medido com um paquímetro e as bactérias classificadas em sensível, moderadamente resistente ou resistente, segundo o padrão demonstrado na Tabela 3.

Todas as bactérias foram testadas quanto à sua tolerância a ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), cefuroxima (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), neomicina (30 µg), penicilina g (10 U) e tetraciclina (30 µg). Com o resultado foi possível testar doses superiores desses antibióticos.

Tabela 3: Determinação da tolerância de procariontos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição.

ANTIBIÓTICOS OU QUIMIOTERÁPICOS	SÍMBOLO	POTÊNCIA DO DISCO	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS		
			Resistente	Moderadamente resistente	Sensível
Ampicilina (enterococos, Gram negativos)	AP	10 µg	≤ 11	12 – 13	≥ 14
Clorafenicol	CO	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Eritromicina	EI	15 µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18
Estreptomicina	ET	10 µg	≤ 11	12 – 14	≥ 15
Nalidíxico, ácido	NA	30 µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19
Neomicina	NO	30 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Cefuroxima (cefalosporinas)	CF	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Tetraciclina	TT	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19

4.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico das estirpes foi extraído anteriormente por RIBEIRO et al., 2013, utilizando o kit AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences).

4.4.2 Amplificação por PCR e purificação do gene 16S rRNA e genes selecionados para a análise de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA).

Amplificação por PCR e purificação do Gene 16S rRNA e genes *housekeeping* foi realizado por RIBEIRO et al, 2013. Todas as estirpes foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA por PCR (WEISBURG et al., 1991; MENNA et al., 2006; MARTENS et al., 2007; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009; RIBEIRO et al, 2009).

Os genes *housekeeping* utilizados neste estudo foram selecionados com base em trabalhos já publicados (GAUNT et al., 2001; STEPKOWSKI et al., 2005; MARTENS et al., 2007, 2008; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009; RIBEIRO et al, 2009; ROMA-NETO; RIBEIRO; HUNGRIA, 2010). Foram utilizados os genes *recA* (GAUNT et al., 2001), *glnII* (STEPKOWSKI et al., 2005) e *gyrB* (MARTENS et al., 2008), (Tabela 4). Após o realizar a reação de PCR, a purificação foi realizada com o Kit PureLink (Invitrogen). *Primers* e as condições de amplificação de sequências parciais do gene 16S rRNA (MENNA et al., 2006), *recA* (GAUNT et al., 2001), *glnII* (STEPKOWSKI et al., 2005), *gyrB* (MARTENS et al., 2008) foram obtidos conforme indicados por esses autores. Após a reação de PCR e a purificação do produto, o sequenciamento foi realizado como descrito por Ribeiro et al. (2009) em um sequenciador capilar MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences).

Tabela 4. Primers utilizados para amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e genes *housekeeping*.

GENE	PRIMER	SEQUENCIA 5'- 3'	*TAMANHO	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
16S rRNA	fD1 rD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' 5' - AAGGAGGTGATCCAGCC– 3'	1338 pb	2 min 95 °C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	WEINSBURG et al., (1991)
<i>glnII</i>	TSglnII _f TSglnII _r	5'- AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGA CGG-3' 5'- SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTGCG- 3' 5'- CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGT GGA-3'	480 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI et al., (2005)
<i>recA</i>	recA6f recA555r	5'- CGRATCTGGTTGATGAAGATCAC CAT -3' 5'-	396 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI et al., (2005)
<i>gyrB</i>	gyrB343f gyrB1043r	5'- TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG-3' 5'- AGCTTGTCTTSGTCTGCG-3'	580 pb	5 min 95°C, 5 x (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 x (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	MARTENS et al. (2008)

4.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento dos genes das estirpes do grupo PEL 4 foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (RIBEIRO et al, 2013). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os fD1,Y2, rD1 (regiões alvo de *Escherichia coli*, estirpe K12, região alvo 362-339), 362f (região alvo 339–362) e 786f (região alvo 764-786), (WEINSBURG et al., 1991, MENNA et al., 2006) (Tabela 5). Para os genes *housekeeping*, os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os mesmos utilizados para o PCR, porém, com uma concentração de 1,5 pmol/μL.

Tabela 5. *Primers* e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S rRNA.

GENE	PRIMER	SEQUENCIA 5'- 3'	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
	fD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'		WEINSBURG et al., (1991)
	Y2	5'- CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA GT – 3'		YOUNG; DOWNER; EARDLY (1991)
16S rRNA (1500)pb	1203f	5'- GAGGTGGGGATGACGTCAAGTC CTC – 3'	1 min 96°C, 40 x (15s 96° C, 15s 55° C, 4 min 60° C)	MENNA et al. (2006)
	362f	5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GG – 3'		MENNA et al. (2006)
	786f	5'- CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG G – 3'		MENNA et al. (2006)

4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências geradas foram submetidas ao programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 5.1 (TAMURA et al., 2011) com modelo de distância K2P (KIMURA, 1980) e algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 repetições (HEDGES, 1992).

4.6 Box-PCR

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se o primer BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de Fernandes e Hungria (2003), Kaschuk et al. (2006) e Menna et al. (2009b). A reação foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 13,8 µL de água Milli-Q estéril; 5,0 µL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol/L de cada base); 2,5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl₂, (50 mmol/L); 1,0 µL de *primer* (50 pmol/µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq (5 U/µL).

As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); um ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C (HUNGRIA et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Considerando os parâmetros morfológicos, o grupo PEL 4 (*Rhizobium* sp. CNPSo 659, 683, 670, 671, 672 e 676) quando comparado com as demais estirpes geneticamente relacionadas, apresentaram características similares às do gênero *Rhizobium*, havendo apenas algumas diferenças em relação às características de produção de muco, consistência da massa de crescimento, detalhes ópticos e diâmetro médio das colônias (Tabela 6).

O resultado do grupo PEL 4 e das outras cinco estirpes geneticamente relacionadas, foram 100% idênticos para algumas características, onde apresentaram crescimento rápido (até três dias), forma da colônia circular, elevação da colônia convexa, borda da colônia lisa, superfície da colônia lisa, coloração creme quando crescidas em meio com YMA com indicador azul de bromotimol, e coloração rosada quando crescidas em meio YMA contendo VC (dados não mostrados).

Em uma faixa de 2 mm a 5 mm o grupo PEL 4 apresentou diâmetro médio de 2,5 mm e as estirpes geneticamente relacionadas apresentaram diâmetro médio de 2,08 mm após o terceiro dia da manifestação de crescimento. A produção de muco foi moderada, como a maioria das outras espécies, exceto por *Rhizobium fabae*, com produção de muco abundante.

Para os detalhes ópticos o grupo PEL 4 apresentou a característica de opacidade, tendo diferido das estirpes geneticamente relacionadas *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. fabae*, as quais apresentaram transparência. Por fim, o estudo demonstrou um resultado variado quando analisada a característica de consistência de massa de crescimento, em que as estirpes *Rhizobium* sp. CNPSo 670 e 676 apresentaram gomosidade nas suas colônias, característica idêntica às estirpes *R. etli* e *R. phaseoli*. As demais estirpes apresentaram consistência viscosa (Tabela 6).

As características morfológicas do gênero *Rhizobium* fornecem importantes informações para a sua classificação e identificação, apesar de

não serem suficientes para discriminar espécies. Segundo Hameed et al. (2004), o estudo das características morfológicas revela uma extensa diversidade dos isolados de rizóbio. Esses dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies.

Tabela 6. Propriedades morfológicas das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas.

CNPSO	SINÔNIMO	DIÂMETRO (3 DIAS APÓS A MANIF. CRESCIMENTO)	PRODUÇÃO DE MUCO	DETALHES ÓPTICOS	COSISTÊNCIA DA MASSA DE CRESCIMENTO
670	<i>R. sp.</i> CNPSo	2,22 mm	Moderada	Opaco	Gomosa
671	<i>R. sp.</i> CNPSo	2,12 mm	Moderada	Opaco	Viscosa
672	<i>R. sp.</i> CNPSo	2,45 mm	Moderada	Opaco	Viscosa
676	<i>R. sp.</i> CNPSo	3,31 mm	Abundante	Opaco	Gomosa
659	<i>R. sp.</i> CNPSo	3,04 mm	Moderada	Opaco	Viscosa
683	<i>R. sp.</i> CNPSo	1,99 mm	Moderada	Opaco	Viscosa
134	<i>R. leguminosarum</i> sv. <i>viceae</i> USDA 2370 ^T	2,16 mm	Moderada	Transparente	Viscosa
140	<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	1,64 mm	Moderada	Transparente	Gomosa
2057	<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	1,73 mm	Moderada	Opaco	Gomosa
2058	<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	1,72 mm	Moderada	Opaco	Viscosa
2059	<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	3,14 mm	Abundante	Transparente	Viscosa

5.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

5.2.1 Crescimento em diferentes meios de cultura, temperaturas, condições de pH e salinidade.

Na análise de crescimento em diferentes meios de cultura, nenhuma das bactérias estudadas foram capazes de crescer em meio LB (tabela 7). Quando o meio YM foi enriquecido com ureia, apenas a estirpe geneticamente relacionadas *R. fabae* e a estirpe do grupo PEL 4 CNPSo 683, utilizaram fracamente a ureia (Figura. 3). Todas as outras estirpes testadas utilizaram a uréia de forma eficiente (Tabela 7). Nenhuma das estirpes cresceram em meio PY sem calcio e em meio LB (Tabela 7).

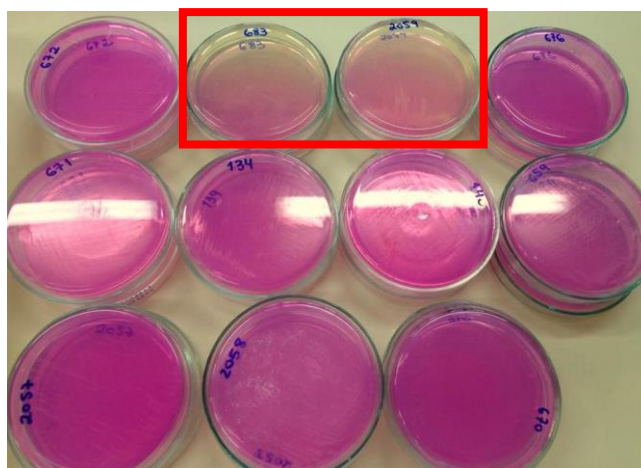


Figura 3. Resultado da análise em meio YM enriquecido com ureia após 3 dias da incubação.

Considera-se que o pH ótimo para o crescimento da maioria dos rizóbios é 7, embora algumas estirpes possam crescer em pH baixos como é o caso das estirpes *Rhizobium tropici* CIAT 899^T e *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401^T que cresceram no pH 4,0 em um trabalho conduzido por RIBEIRO et al, 2012. O experimento foi conduzido com dois valores de pH: pH 6,8 e pH 4,0, sendo possível observar, na Tabela 7, que todas as estirpes foram capazes de crescer em pH 6,8 e nenhuma em pH 4,0. Rizóbios são bastante afetados pelo pH do solo, considerado como um dos principais atributos edáficos limitantes a essas bactérias (FIGUEIREDO et al., 1996). O grupo PEL4 se mostra distinto de microssimbiontes do feijoeiro encontrados

nos solos brasileiros, *R. tropici* e *R. leucaenae*, em geral tolerantes à acidez (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al., 2000; RIBEIRO et al., 2012).

Os testes de tolerância à salinidade e diferentes temperaturas são fatores importantes para a descrição e a caracterização de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Esses fatores fazem parte de algumas características essenciais destes organismos, pois podem inibir o crescimento e a multiplicação das bactérias, de modo que a tolerância pode ser resultado da adaptação ao meio ambiente em que se estabelecem (ELBOUTAHIRI; THAMI-ALAMI; UDUPA, 2010). Neste estudo, quando as bactérias foram incubadas em meio YM suplementado com 1% de NaCl, o grupo PEL 4 apresentou resultado negativo de crescimento, característica que compartilha com as estirpes geneticamente relacionadas *R. leguminosarum*, *R. etli* e *R. pisi*, diferenciando apenas das estirpes *R. phaseoli* e *R. fabae*, que apresentaram resultado positivo de crescimento (Tabela 7).

Diversos rizóbios não toleram altas concentrações de sal, em geral superiores a 1% de NaCl (KUYKENDALL, 2005). Nos testes de resistência à salinidade realizados por Freitas et al. (2007), observou-se que todos os isolados cresceram rapidamente até o nível de 1,2% de sal nos meios ajustados para pH 6,8 e 8,0 e a sensibilidade ao sal foi verificada a partir da adição de 1,6%. A tolerância a baixas concentrações de sal (1%) também foi observada por Medeiros et al., (2007) e Singh et al. (2008).

A temperatura ótima para o crescimento de rizóbio é de 28°C (VINCENT, 1970), podendo algumas espécies mostrar bom crescimento a temperaturas de 40°C, como *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Neste trabalho todos os isolados, principalmente os pertencentes ao grupo PEL 4 mostraram um crescimento abundante à temperatura de 28°C. Nenhuma estirpe do grupo PEL 4, nem as estirpes geneticamente relacionadas cresceram a 28°C e 30°C (Tabela 7). Em geral, o crescimento de rizóbios é restrito a faixas estreitas de temperatura, em torno de 35°C a 45°C (RAMÍREZ-BAHENA et al. 2008).

Novamente deve-se salientar que espécies dominantes de rizóbios em solos ácidos brasileiros, *R. tropici* e *R. leucaenae* apresentam tolerância a temperaturas elevadas (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1992; HUNGRIA et al., 2000; RIBEIRO et al., 2012). Contudo, as propriedades encontradas nas estirpes do grupo PEL 4 são, em geral, semelhantes às das espécies geneticamente relacionadas a elas, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* e *R. fabae* (Tabela 7).

Tabela 7. Diferenças morfológicas das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas utilizadas nesse estudo.

Estirpe <i>Rhizobium. sp.</i> CNPSo	Temperaturas			pH		Meio c/ 1% NaCl.	Meio LB	PY- Ca	Meio c/ ureia
	28°C	37°C	40°C	4,0	6,8				
<i>R. sp.</i> CNPSo 683	+	-	-	-	+	-	-	-	W
<i>R. sp.</i> CNPSo 670	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. sp.</i> CNPSo 671	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. sp.</i> CNPSo 672	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. sp.</i> CNPSo 676	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. sp.</i> CNPSo 659	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	+	-	-	-	+	+	-	-	W

(+)Utilizou positivamente; (-)Não utilizou; (w)Utilizou fravamente

5.2.2 Utilização de fontes de carbono

As estirpes foram testadas quando à habilidade em metabolizar 49 fontes de carbonos utilizando o 50CH kit. Somente aquelas que apresentaram diferenças entre o grupo PEL 4 e as estirpes geneticamente relacionadas *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. fabae*, *R. phaseoli* e *R. pisi* são mostradas na Tabela 8.

O grupo PEL 4, apresentou crescimento positivo para as fontes Glicerol, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Ribose, L-Xilose, Esculina, Citrato de ferro, D-Fucose e D-Galactose, utilizou fracamente as fontes D-Glicose, D-Frutose, Inositol, D-Manitol, Glucopiranosido, Salicina, D-Celiobiose, D-Maltose, D-Lactose, D-Turanose, D-Rafinose, Gentiobiose e D-Lixose. Já os carboidratos Eritritol, L-Sorbose, Dulcitol, Metil- α -Manopiranosido, N-Acetilglucosamina, Arbutina, Amigdalina, Inulina, D-Melezitose, Potassio Gluconato, TE cetogluconato, Potassio 5-cetogluconato e D-Tagatose, apresentaram crescimento negativo para o grupo PEL 4 (CNPSO 670; 671; 672; 676; 683; 659) e estirpes geneticamente relacionadas (*R. leguminosarum*; *R. fabae*; *R. pisi*; *R. etli* e *R. phaseoli*).

As estirpes do grupo PEL 4 apresentaram algumas diferenças entre si (Tabela 8). A estirpe CNPSO 671 usou positivamente as fontes D-melibiose, D-sacarose e D-trehalose, enquanto as demais usaram fracamente. O meio D-Manose apresentou reação positiva para a estirpe CNPSO 670, diferindo das demais estirpes que utilizaram fracamente essa fonte. Também houve fraca utilização do meio D-sorbitol pelas estirpes CNPSO 671, 672, 676 e 683, enquanto que demais foram negativas. Além disso, a estirpe CNPSO 670 não utilizou o meio com xilitol, diferenciando-se das demais estirpes, que utilizaram fracamente. O glicogênio só foi utilizado fracamente pela estirpe CNPSO 672, enquanto as demais estirpes do grupo não foram capazes de utilizá-lo. As estirpes CNPSO 676, 683 e 659 usaram fracamente a fonte D-adonitol,

enquanto as demais apresentaram reação negativa, característica que compartilham com L-arabitol, havendo apenas uma diferença, de que a estirpe CNPSo 671 utiliza fracamente essa fonte de carbono. As estirpes CNPSo 670, 672 e 659 foram positivas para metil- β -D-xilopiranosido, enquanto que as demais utilizaram fracamente essa fonte.

Tabela 8. Diferenças entre as estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas quanto à utilização de fontes de carbono avaliada por API 50CH kit. 1) *Rhizobium* sp. CNPSo 670; 2) *Rhizobium* sp. CNPSo 671; 3) *Rhizobium* sp. CNPSo 672; 4) *Rhizobium* sp. CNPSo 676; 5) *Rhizobium* sp. CNPSo 683; 6) *Rhizobium* sp. CNPSo 659; 7) *R. leguminosarum*; 8) *R. fabae*; 9) *R. pisi*; 10) *R. etli*; 11) *R. phaseoli*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
glicerol	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+
eritritol	-	-	-	-	-	-	-	w	w	+	-
d-xilose	-	+	+	w	+	+	w	w	w	+	w
d-adonitol	-	-	-	w	w	w	w	w	w	w	w
metil-βd-xilopiranosido	+	w	+	w	+	w	w	w	w	w	w
d-galactose	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	w
d-glicose	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
d-frutose	w	w	w	w	w	w	w	+	w	+	w
d-manose	+	w	w	w	w	w	w	+	w	+	w
l-sorbose	-	-	-	-	-	-	w	w	w	-	-
l-rhamnose	+	+	w	+	w	+	w	+	+	w	w
dulcitol	-	-	-	-	-	-	w	w	w	w	-
inositol	w	w	w	w	w	w	w	+	w	+	+
d-manitol	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
d-sorbitol	-	w	w	w	w	-	w	w	w	w	w
metil-αd-manopiranosido	-	-	-	-	-	-	w	w	w	-	-
metil-αd-glucopiranosido	w	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w
n-acetilglucosamina	w	w	w	w	w	w	-	-	+	+	-
amigdaline	-	-	-	-	-	-	-	w	w	w	w
arbutina	w	w	w	w	w	w	w	w	w	+	w
d-maltose	w	w	w	w	w	w	w	+	w	+	w
d-melibiose	w	+	w	w	w	w	w	w	w	w	w
d-sacarose	w	+	w	w	w	w	w	w	w	+	w
d-trehalose	w	+	w	w	w	w	w	w	w	+	w
glicogênio	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-
xilitol	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
d-turanose	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
d-tagatose	-	-	-	-	-	-	w	w	w	w	-
l-fucose	w	+	+	+	w	w	w	+	+	+	w
d-arabitol	+	+	+	w	w	+	w	+	w	w	w
l-arabitol	-	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w

(+) Reação positiva; (-) Reação negativa; (w) Reação fraca

As estirpes CNPSo 670, 671, 676 e 659 foram positivas para L-rhamnose, e as estirpes CNPSo 670, 671, 672 e 659 foram positivas para D-arabitol, enquanto as demais estirpes utilizaram fracamente essas fontes de carbono. Em relação à D-xilose, as estirpes CNPSo 671, 672, 683 e 659 apresentaram reação positiva, a CNPSo 676 crescimento fraco e a 670 não foi capaz de utilizar essa fonte de carbono (Tabela 8).

5.2.3 Tolerância a Antibióticos

A tolerância aos antimicrobianos é um teste comumente realizado em caracterização de bactérias, incluindo rizóbios (VALVERDE et al., 2006; RAMIREZ, BAHENA et al, 2008). Nesse estudo, essa análise foi realizada pelo método de Disco-Difusão, havendo algumas diferenças entre as estirpes do grupo PEL 4 (Tabela 9).

De um modo geral, o padrão de tolerância aos antibióticos foi relativamente constante em todas as amostras, havendo algumas diferenças entre as estirpes em estudo. O grupo PEL 4 apresentou sensibilidade para cefuroxina (30 µg), estreptomicina (10 µg) e tetraciclina (30 µg) (Tabela 9). Todas as estirpes estudadas foram tolerantes ao antibiótico bacitracina e a estirpe CNPSo 672 também foi tolerante aos antibióticos nalmicina e neomicina (30 µg). A estirpe CNPSo 670 apresentou resultado moderadamente tolerante para o antibiótico eritromicina (15 µg) e Neomicina, assim como a estirpe CNPSo 672 para o antibiótico cloranfenicol (30 µg). As estirpes CNPSo 676 e 659 toleram moderadamente o antibiótico Neomicina e a estirpe 659 compartilhou esse resultado em relação ao antibiótico Eritromicina. Todas as demais estirpes do grupo PEL 4 apresentaram resultado de sensibilidade em relação aos demais antibióticos.

Tabela 9. Tolerância das estirpes do grupo PEL 4 e estirpes geneticamente relacionadas a diferentes antibióticos. 1) *Rhizobium* sp. CNPSo 670; 2) *Rhizobium* sp. CNPSo 671; 3) *Rhizobium* sp. CNPSo 672; 4) *Rhizobium* sp. CNPSo 676; 5) *Rhizobium* sp. CNPSo 659; 6) *Rhizobium* sp. CNPSo 683; 7) *Rhizobium leguminosarum*; 8) *R. fabae*; 9) *R. pisi*; 10) *R. etli*; 11) *R. phaseoli*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Bacitracina (BC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clorafenicol (CO)	-	-	mt	-	-	-	mt	+	-	-	-
Cefuroxima (CF)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	mt	+	-	-	mt	-	-	-	-	mt	-
Estreptomicina (ET)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nalmicina	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Neomicina	mt	-	+	mt	mt	-	-	mt	+	-	mt
Tetraciclina (TT)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

(+) tolerante; (mt) moderadamente tolerante; (-) sensível

Em comparação com as estirpes geneticamente relacionadas, apenas dois resultados foram idênticos ao do grupo PEL 4 e todas as demais estirpes geneticamente relacionadas: Tolerância a bacitracina e sensibilidade a cefuroxima. A maior diferença foi encontrada com *R. fabae*, diferindo em três dos oito antibióticos testados, sendo essa dissimilaridade quanto à tolerância aos antimicrobianos Cloranfenicol, Estreptomicina e Nalmicina. O grupo PEL 4 também apresentou baixa tolerância à Nalmicina, exceto pela estirpe CNPSo 672. Entre as estirpes de geneticamente relacionadas somente *R. etli* também foi sensível a esse antibiótico, (Tabela 9).

5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

5.3.1 BOX-PCR

Na análise por BOX-PCR, foi constatado que todas as estirpes apresentaram perfis únicos de DNA amplificado, exceto as CNPSo 672 e 659, que foram idênticas (Figura 4). Cabe salientar que a estirpe CNPSo 672 foi isolada no Equador e a 659 no México. A análise dos perfis de DNA resultou em um dendograma onde o grupo PEL 4 apresentou um elevado grau de similaridade (87,6%). As estirpes CNPSo 672, 659, 676, 671 e 670 do grupo PEL 4 apresentaram 93% de similaridade entre si e a estirpe 683 exibiu 87% de similaridade com essas cinco estirpes. O grupo PEL 4 separou-se das demais espécies de *Rhizobium* geneticamente relacionadas (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium pisi*, e *Rhizobium fabae*).

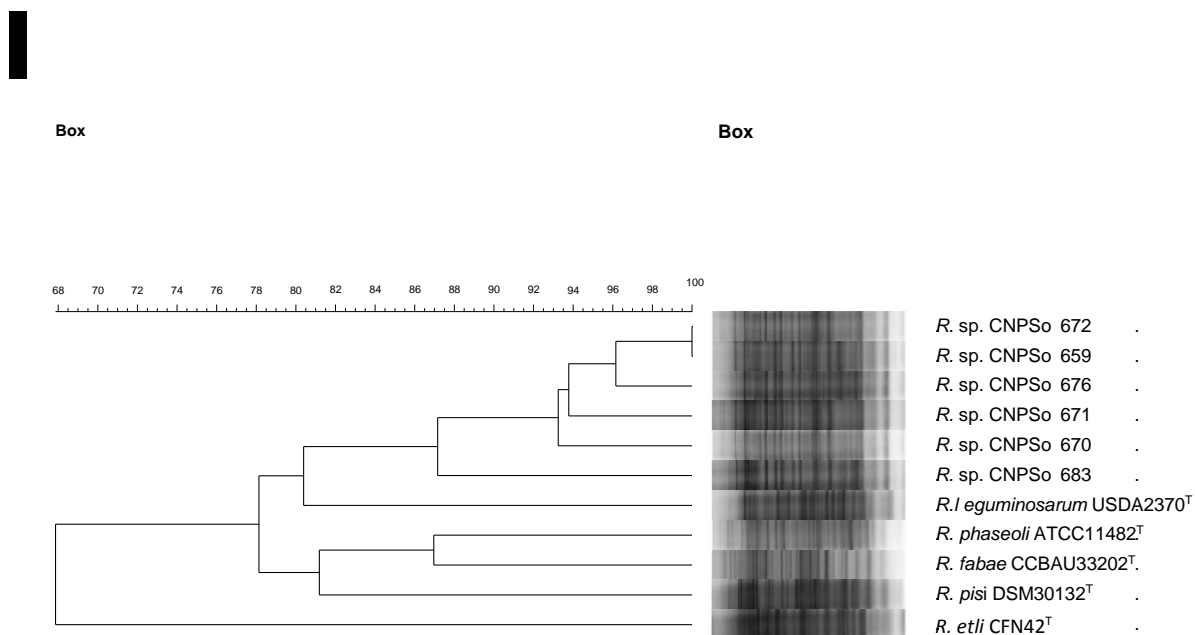


Figura 4. Dendrograma baseado nos perfis de DNA amplificados pela metodologia de BOX-PCR. Os agrupamentos foram obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.6). Para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard com 1% de tolerância.

Embora a análise de BOX-PCR nem sempre seja adequada para avaliar relações taxonômicas, os resultados obtidos revelam diversidade genética entre as estirpes e confirmam que a análise por BOX-PCR é eficiente para discriminá-la. Com isso, o uso de técnicas moleculares deve ser estimulado devido ao desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, inclusive para estudos em nível de gênero e espécie (KIRK et al., 2004).

5.3.2 16S rRNA

Uma árvore filogenética foi construída, com base nas sequências de 16S rRNA dos isolados PEL 4 e as estirpes geneticamente relacionadas, utilizando o modelo K2P para estimar distâncias filogenéticas e o algoritmo de Neighbor-Joining (Figura 5). Os números de acesso das estirpes analisadas podem ser visualizados na Tabela 10.

Com base na árvore filogenética do 16S rRNA, foi observado que as estirpes do grupo PEL 4 (CNPSO 670, 671, 672, 676 e 659) ficaram próximas entre si, formando um grupo irmão com *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium fabae* e *Rhizobium pisi*. Somente a estirpe CNPSO 683 ocupou uma posição um pouco mais distante no grupo. A estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* foi incluída na árvore para discriminar as relações filogenéticas (Figura 5). A alta similaridade dentro do grupo *Rhizobium etli/Rhizobium fabae/Rhizobium leguminosarum* também já foi observada em estudos anteriores com a análise filogenética do gene ribossomal 16S (RIBEIRO et al., 2013).

O grupo PEL 4 e as demais espécies analisadas na árvore de 16S, não ficaram claramente separadas, com isso, pode-se dizer que o poder de resolução do gene 16S rRNA não permitiu boa definição da posição taxonômica das estirpes deste estudo (Figura 5).

16S

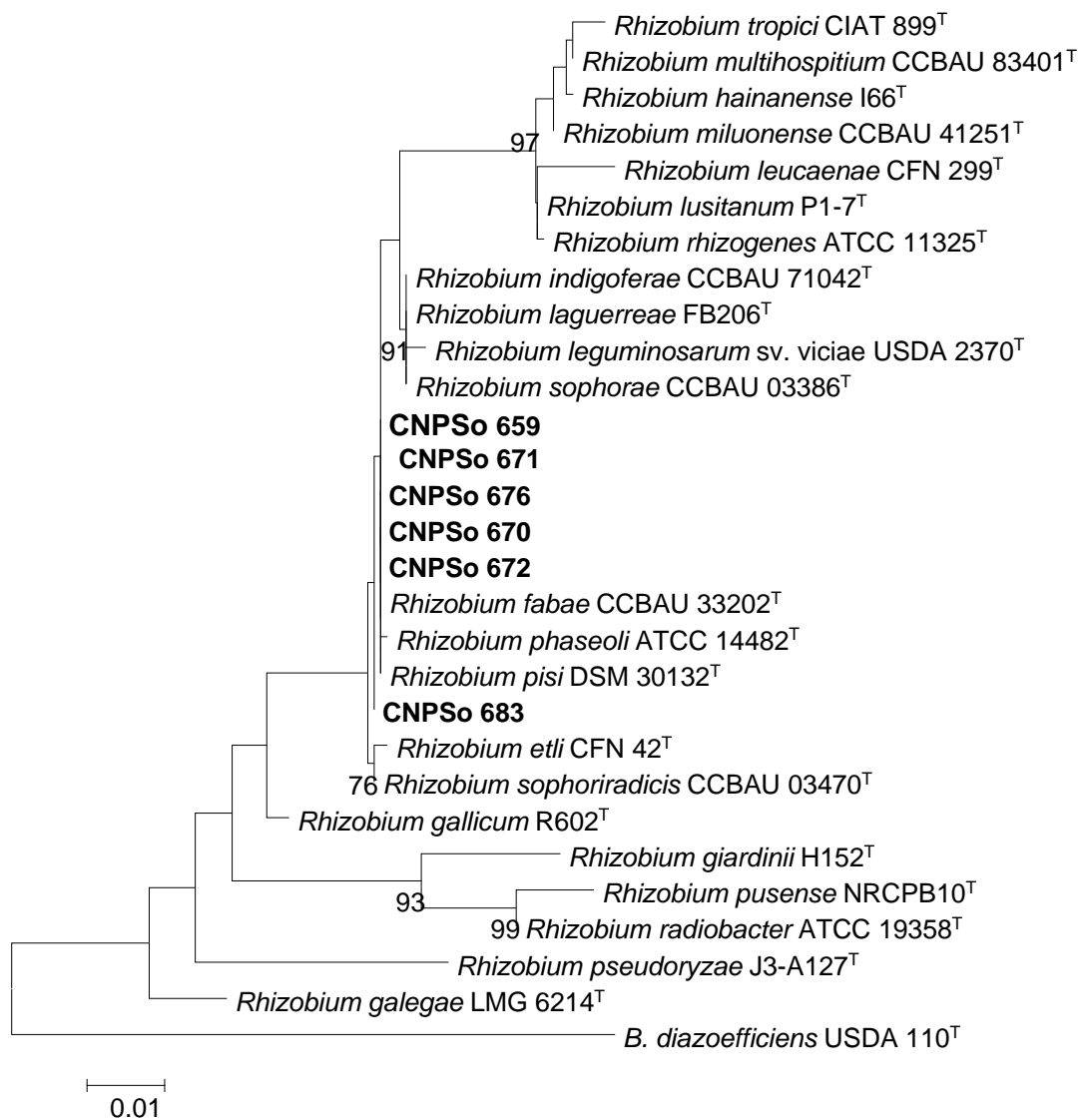


Figura 5. Árvore filogenética das estirpes do grupo PEL 4 e outras espécies geneticamente relacionadas, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 repetições.

Apesar do gene 16S rRNA ser amplamente utilizado nos estudos taxonômicos de rizóbios como marcador molecular, deve-se observar algumas

limitações, incluindo a taxa de evolução lenta, recombinação gênica e transferência horizontal de genes, o que pode tornar o 16S rRNA um marcador de difícil discriminação entre espécies estreitamente relacionadas (VAN BERKUM et al, 2003; SILVA et al., 2005; WILLEMS, 2006). Uma alternativa como marcador filogenético visando superar essas limitações é a análise de MLSA, que utiliza sequências de vários genes que codificam proteínas conservadas (*housekeeping*) (GEVERS et al., 2005). O MLSA tem sido amplamente aplicado em diferentes gêneros de rizóbios (MARTENS et al, 2007, 2008; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009; RIBEIRO et al, 2009; DELAMUTA et al., 2013; DALL'AGNOL et al., 2013, 2014).

Tabela 10. Números de acesso do GenBank para a sequência utilizadas neste estudo.

Estirpe	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>
CNPSo 670	KC293511	KC293531	KC293517	KC293520
CNPSo 671	JN129381	JN129351	JN129306	JN129336
CNPSo 672	JN129382	JN129352	JN129307	JN129337
CNPSo 676	KC293514	KC333885	KC333883	KC333884
CNPSo 683	JN129386	JN129356	JN129311	JN129341
CNPSo 659	JN129374	JN129344	JN129399	JN129329
<i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	U29386	AF169586	AM418830	AJ294376)
<i>Rhizobium fabae</i> ^T	DQ835306	EF579941.1	EF579935.1	KC293523
<i>Rhizobium pisi</i> ^T	DQ431676	JN580715	KC293522	KC293522
<i>Rhizobium phaseoli</i> ^T	NR_044112	EF113136.1	JN580716.1	KC293518
<i>Rhizobium etli</i> ^T	CP000133	CP000133	CP000133	CP000133
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	U89832	AF169584	HQ438238	AJ294373
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	EF035074	EF490040	KC290040	EF490029
<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T	U71078	GU726294	HQ438236	HQ394252
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	EF061096	HM047120	KC293527	HM047131
<i>Rhizobium leucaena</i> CFN 299 ^T	X67234	AF169583	KC293524	AJ294372
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T	AY738130	EF639841	KC293525	DQ431674
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	AY945955	FJ816281	AM418833	CP000628
<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T	AY034027	EF027965.1	JN580717.1	ND
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	JN558651	JN558681.1	ND	ND
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 ^T	KJ831225	ND	ND	ND
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	KJ83122	ND	ND	ND
<i>Rhizobium gallicum</i> R602 ^T	EU488748	AF529015	AM418828	AY907357
<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T	EU488750	EU488778	HQ438240	AM182123
<i>Rhizobium pusense</i> NRCPB10 ^T	FJ969841	HQ166059.1	HG326946.1	FR870239.1
<i>Rhizobium pseudoryzae</i> J3-A127 ^T	NR115801.1	HM132108	HM132107	EU732539)

5.3.3 Genes *housekeeping* analisados separadamente (*glnII*, *gyrB* e *recA*)

Nesse estudo, três genes *housekeeping*, *gyrB*, *recA* e *glnII*, foram utilizados para a aplicação da metodologia do MLSA. Foi construída uma árvore filogenética para cada gene e os números de acesso constam na Tabela 10. Todas as espécies em estudo foram claramente diferenciadas, formando ramos distintos das estirpes geneticamente relacionadas, conforme pode ser observado na Figura 6 A, B, C. Os genes *housekeeping* apresentaram maiores informações sobre a filogenia das bactérias em estudo do que o 16S rRNA.

Em nível interespecies, observou-se que cada árvore construída, para o grupo PEL 4, teve a formação de um grupo separado das demais espécies geneticamente relacionadas, com alto valor de *bootstrap*. O gene *glnII* (Figura 6A) resultou em um valor de *bootstrap* de 99%, *gyrB* 100% (Figura 6B) e *recA* 98% (Figura 6C) onde somente dentro desse gene teve a formação de dois grupos separados com 99% de *bootstrap* que foram: grupo CNPSo 670, 671 e 672 e CNPSo 683, 676 e 659. A estirpe-tipo mais próxima dos agrupamentos dos genes *glnII* e *gyrB* foi *Rhizobium leguminosarum*, com 71% e 85% de *bootstrap*, respectivamente. A estirpe-tipo mais próxima do agrupamento do gene *recA* foi *Rhizobium etli*. A proposta de que essas estirpes podem representar uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium* é reforçada ao se observar o agrupamento formado nas árvores filogenéticas dos genes *glnII*, *gyrB* e *recA*, sendo que os valores de variação de similaridade por esses genes dentro do grupo PEL 4 são observados de 99,3 a 100 para os três genes concatenados (Tabela 11). Para os genes individuais os valores de variação da similaridade encontrada variou de 99,3 a 100 para o gene *glnII*. O gene *gyrB* variou de 99,8 – 100 e *recA* 97,0 a 100, onde podemos observar valores confiantes de similaridade (Tabela 11).

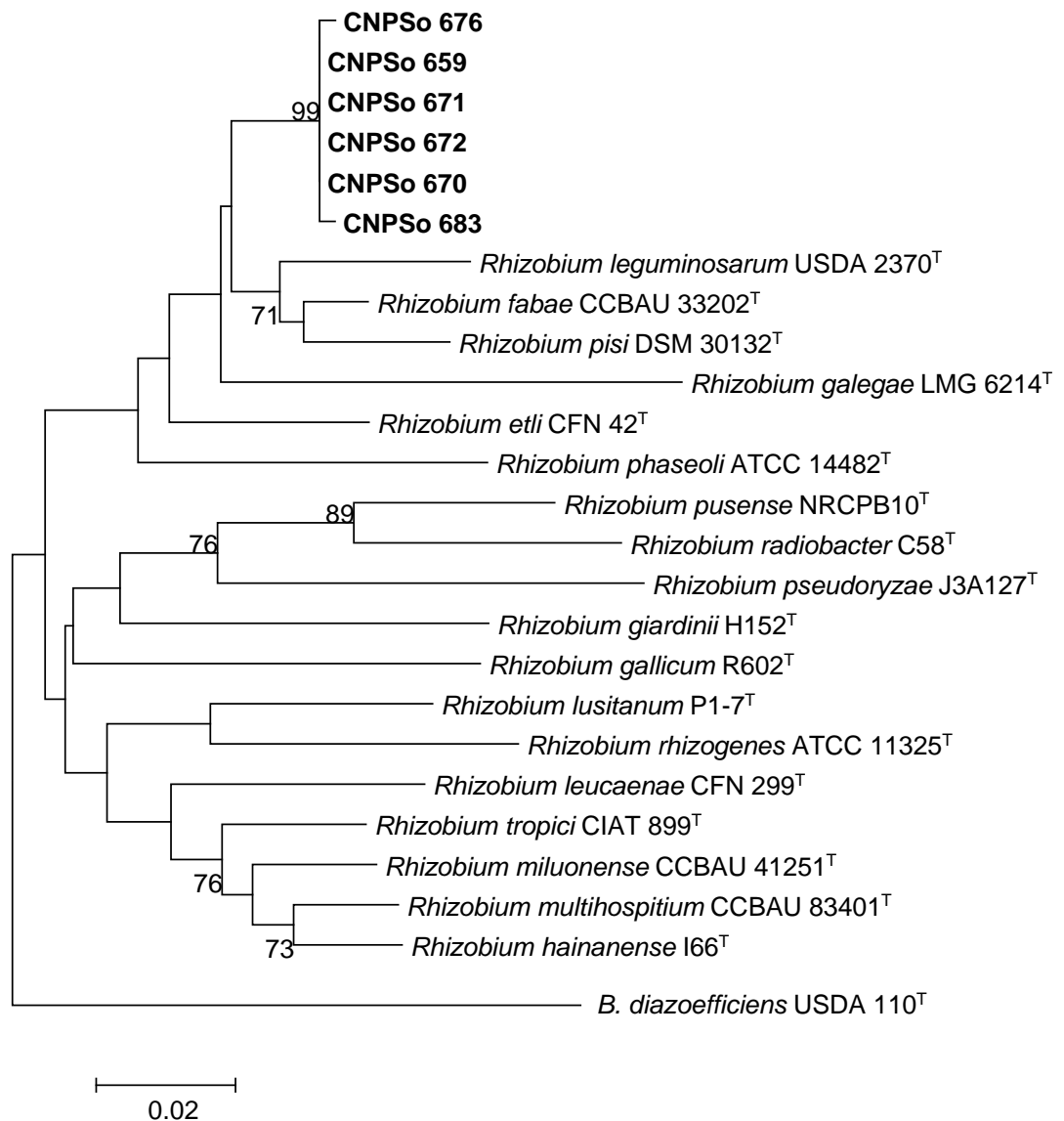
Tabela 11. Variação de similaridade dentro das estirpes estudadas com as estirpes geneticamente relacionadas de *Rhizobium* nos genes 16S rRNA, *glnII*, *gyrB*, *recA* e concatenados.

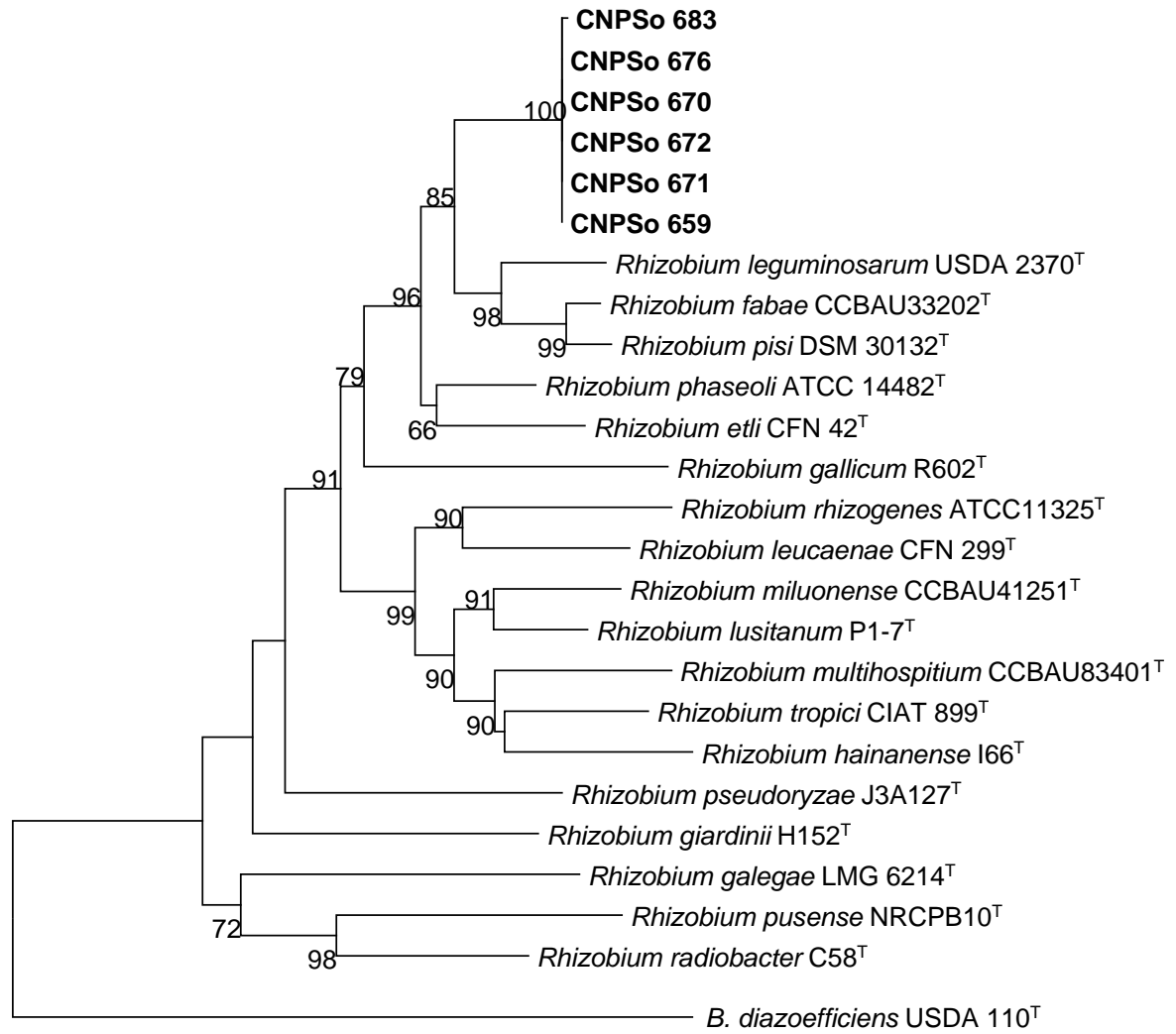
ESTIRPES	GENES (%)				
	16 S	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	Concatenados
Similaridade:					
- dentro das estirpes deste estudo *	99,5 - 100	99,3 - 100	99,8 - 100	97,0 - 100	99,3 - 100
- entre as estirpes deste estudo e estirpes de geneticamente relacionadas:					
<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	99,6 – 99,8	92,4 - 92,8	92,2 – 92,4	89,5 – 89,9	91,8 – 92,0
<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	99,7 – 100	96,6 – 97,1	92,4 – 92,6	92,5 – 92,9	94,0 – 94,2
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	99,7 - 100	95,1 – 95,5	92,1 – 92,2	92,1 – 92,9	93,2 – 93,5
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	99,1 - 99,4	95,1 - 95,3	90,9 – 91,0	93,3 – 94,4	92,8 – 93,2
<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 ^T	99,0 – 99,2	94,6 - 95,1	92,1 – 92,2	93,6 – 94,7	93,2 – 93,7
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	97,5 - 97,7	90,4 – 90,8	85,2 – 85,4	88,5 – 89,5	87,8 – 88,1
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	96,9 – 97,1	90,8 – 91,3	84,0 – 84,7	85,8 – 88,4	87,2 – 87,7
<i>Rhizobium multihosíticum</i> CCBAU 83401 ^T	97,5 – 97,7	89,7 – 90,2	83,1 – 83,5	88,1 – 89,5	86,7 – 87,0
<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T	97,2 - 97,7	89,7 – 90,2	83,3 – 83,5	88,2 – 91,4	86,8 – 87,3
<i>Rhizobium pseudoryzae</i> J3-A127 ^T	95,1 – 95,4	86,8 – 87,1	83,8 – 84,0	86,6 – 87,3	85,6 – 85,7
<i>Rhizobium pusense</i> NRCPB10 ^T	93,2 – 93,4	93,2 – 93,4	78,6 – 78,8	88,1 – 88,8	83,8 – 84,0
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T	97,5 - 97,8	89,5 – 89,7	85,9 – 86,1	88,1 – 88,8	87,7 – 87,9
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	97,7 – 98,0	88,0 – 88,2	84,2 – 84,3	85,1 – 86,6	85,8 – 86,1
<i>Rhizobium leucanae</i> CFN 299 ^T	96,8 – 97,1	89,3 – 89,7	85,4 – 85,5	87,7 – 89,5	87,4 – 87,8
<i>Rhizobium gallicum</i> R606 ^T	97,5 – 97,6	89,1 – 89,5	85,7 – 85,9	87,3 – 88,4	87,4 – 87,7
<i>Rhizobium radiobacter</i> C58 ^T	95,1 - 95,2	87,3 – 87,7	81,4 – 81,6	84,7 – 86,2	84,4 – 84,7
<i>Rhizobium galegae</i> LMG 6214 ^T	96,4 – 96,5	96,4 – 96,5	80,2 – 80,4	89,1 – 89,2	86,1 – 86,3
<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T	95,0 – 95,2	95,0 – 95,2	83,3 – 83,5	84,3 – 85,1	85,5 – 85,8

Lu e colaboradores (2011), em seu trabalho de taxonomia e filogenia, verificaram que estirpes pertencentes à mesma espécie possuíam pelo menos 94% de similaridade entre seus genes *housekeeping*. Resultado que pode ser

comparado pelas estirpes do grupo PEL 4 deste estudo, pois apresentaram valores superiores. Assim, pode-se dizer que os resultados obtidos pela avaliação dos genes *housekeeping* individuais fornecem mais um indício que este grupo de estirpes representam uma nova espécie dentro de *Rhizobium*.

glnII(A)



gyrB(B)

0.05

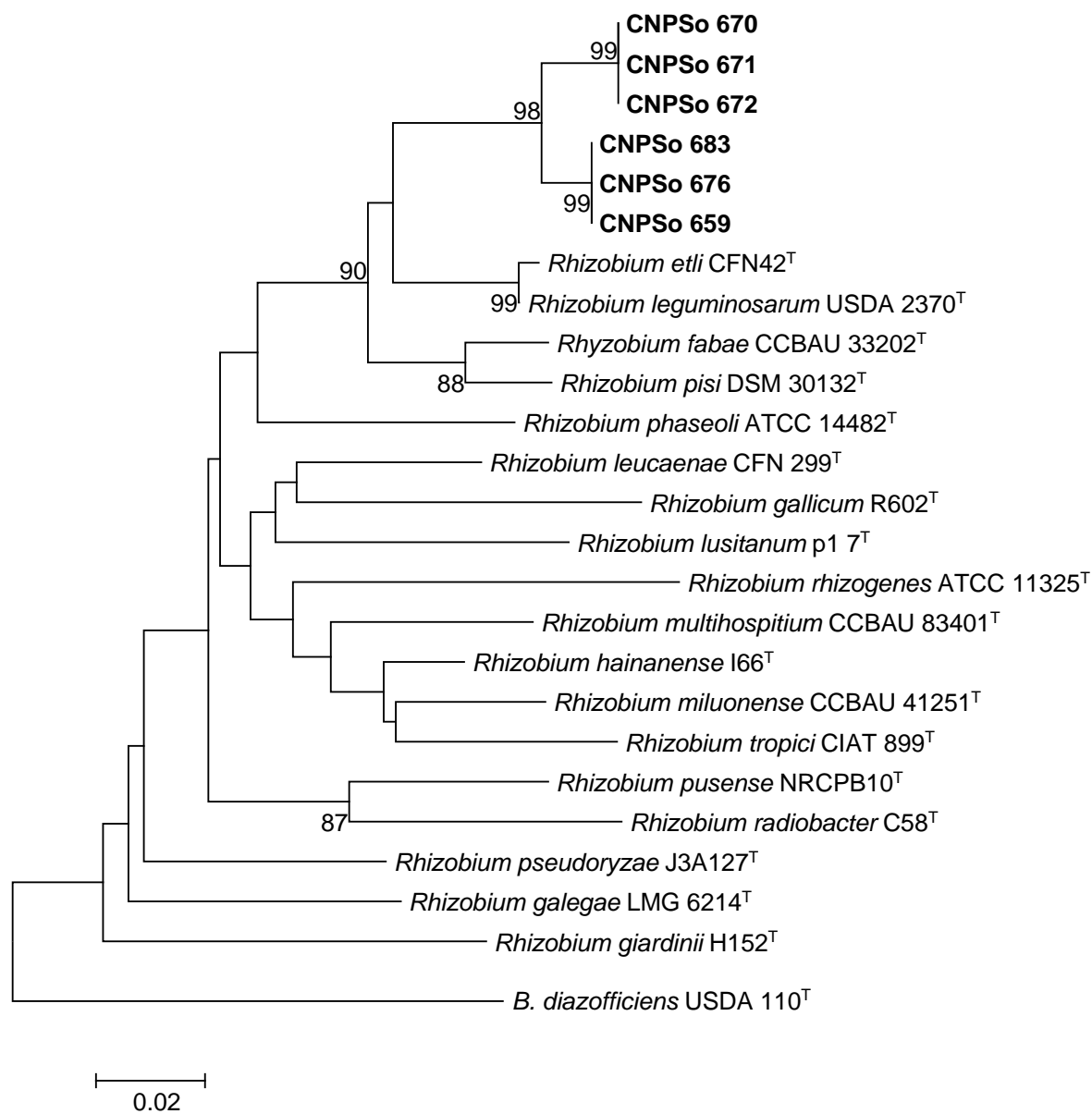
recA(C)

Figura 6. Árvores filogenéticas das estirpes do grupo PEL 4 e outras espécies de rizóbios, baseadas no sequenciamento dos genes *housekeeping glnII* (A), *gyrB* (B), *recA(C)*, analisados separadamente. *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 foram utilizadas como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA

5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. O valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

5.3.4 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

A análise concatenada dos genes na abordagem de MLSA é utilizada para combinar dados congruentes e excluir os dados com níveis significativos de erros que podem ofuscar dados confiáveis. Permite uma melhor resolução na definição de espécies quando comparada com a análise dos genes individuais, além de diminuir os efeitos da transferência horizontal (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2008). No caso deste estudo, houve congruência na análise dos três genes entre si, bem como de cada um com o gene 16S rRNA

O nítido agrupamento formado por todas as seis estirpes (grupo PEL 4) avaliadas neste estudo está representado na árvore filogenética da Figura 7. O grupo PEL 4 posicionou-se separado das demais espécies de *Rhizobium* geneticamente relacionadas, apresentando valor de *bootstrap* de 85% entre CNPSo 670 e 671, 99% entre as estirpes CNPSo 683, 676 e 659, onde obteve um valor de 100% para todo grupo. O valor de *bootstrap* nas árvores filogenéticas construídas para cada gene em particular, variou de 98 à 100%, valores próximos do resultado concatenado. Do mesmo modo a estirpe tipo mais próxima do agrupamento foram *R. leguminosarum*, *R. fabae* e *R. pisi* com 92% de *bootstrap*, sendo um resultado comum ao observado nas árvores dos genes particulares.

Como exemplo de utilização do MLSA para a definição de espécies, em um estudo conduzido por Dall'Agnol e colaboradores (2014), foram utilizados três genes *housekeeping* (*rpoA*, *gyrB* e *recA*) na análise de MLSA para diferenciar quatro estirpes (PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 e H 52) das espécies de *Rhizobium* já existentes. Os autores observaram o agrupamento

de quatro estirpes em um mesmo grupo, com a similaridade variando de 99,7-99,9%. Quando essas quatro estirpes foram comparadas com as bactérias de referencia para rizobio, a espécie *R. leucaenae* foi a mais próxima das quatro estirpes, com uma similaridade de 96,4%. Esses dados indicaram que as espécies utilizadas representavam uma nova espécie de *Rhizobium*, para a qual foi atribuído o nome *Rhizobium paranaense* (DALL'AGNOL et al., 2014).

Vandamme et al. (1991) verificaram que espécies diferentes apresentam menos de 97% de similaridade em suas sequencias de 16S rRNA. Neste estudo pode-se observar na Tabela 11, que os valores de similaridade foram superiores a 99% com as espécies geneticamente relacionadas, representando as espécies de *Rhizobium* mais estreitamente relacionadas com o PEL 4. Esse valor reforça a falta de precisão do 16S rRNA na distinção de espécies de *Rhizobium*. Já na análise por MLSA pode-se esclarecer a posição filogética das estirpes utilizadas nesse trabalho, havendo uma elevada similaridade das sequencias concatenadas entre as estirpes do PEL 4 (> 99,3%) e baixa similaridade entre estas estirpes e espécies geneticamente relacionadas, variando de 83,8 a 94,2% (Tabela 11). Esses dados estão de acordo com as indicações de RIBEIRO et al. (2013), de que as estirpes do grupo PEL 4 devem representar uma nova espécie.

A análise de MLSA permitiu melhor definição taxonômica das estirpes de *Rhizobium* estudadas nesse trabalho. Houve indicação de que as estirpes do grupo PEL 4 devem representar uma nova espécie, mostrando o poder de resolução do MLSA e confirmando o potencial elevado dessa técnica para o conhecimento da biodiversidade e para a definição taxonômica das estirpes. Sendo assim, os resultados obtidos na avaliação desse trabalho indicam que as estirpes do presente estudo são fortes candidatas a representarem uma nova espécie de *Rhizobium*.

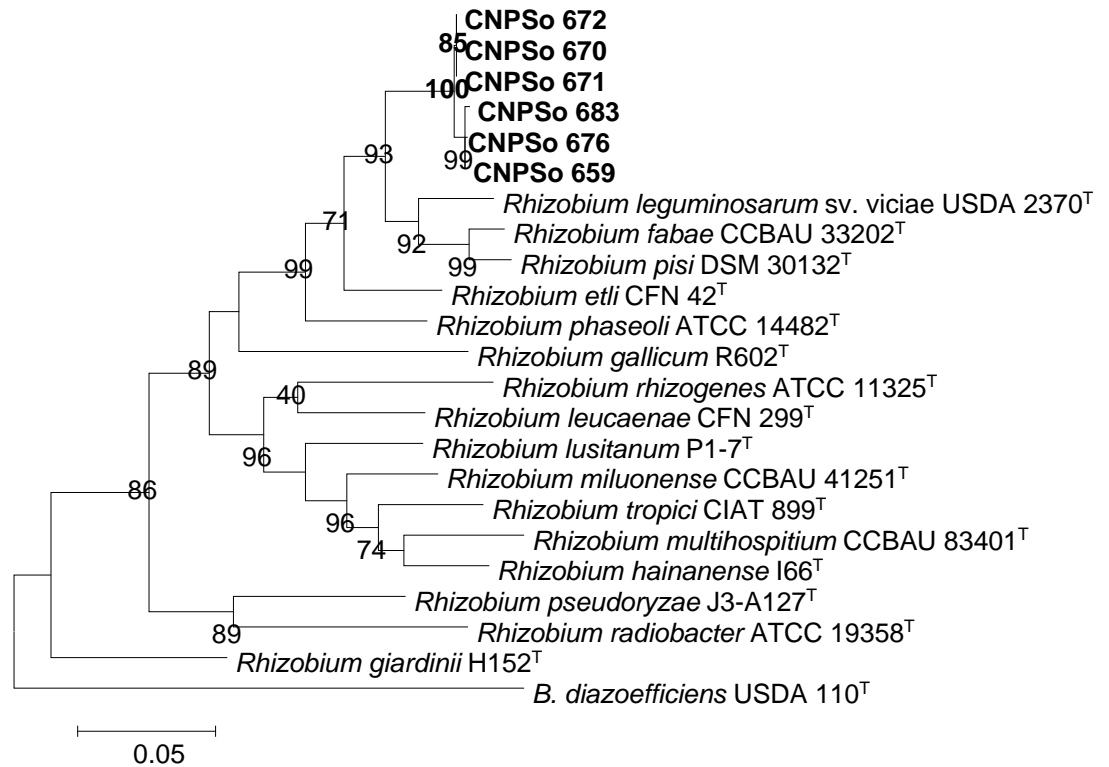
glnII(A) + gyrB(B) + recA(C)

Figura 7. Árvore filogenética, baseada nos genes *housekeeping glnII*, *gyrB* e *recA*, concatenados. *Bradyrhizobium diazoficiens* USDA 110 foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5.1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

6 CONCLUSÃO

Os estudos de filogenia e taxonomia têm se mostrado cada vez mais relevantes para a definição e classificação de estirpes de *Rhizobium*. A análise polifásica deste estudo, incluindo dados morfológicos (crescimento; diâmetro das colônias; alteração do pH; forma, borda, elevação e superfície da colônia; produção de muco; consistência da massa de crescimento; detalhes ópticos e cromogênese), fisiológicos (utilização fontes de carbono e tolerância a antibióticos) e genéticos (perfil de DNA por BOX-PCR, análise do gene 16S rRNA e MLSA de três genes *housekeeping*) indicou fortemente que as estirpes do grupo definido como PEL 4, com estirpes provenientes do Equador e do México, devem representar uma nova espécie de *Rhizobium*.

A metodologia de MLSA mostrou-se eficaz, permitindo identificar a diversidade genética das estirpes. Tanto na análise de genes *housekeeping* individuais, quanto na análise dos genes concatenados, as estirpes agruparam com as mesmas estirpes-tipo geneticamente relacionadas, e foram congruentes com a árvore filogenética gerada para o 16S rRNA, permitindo melhor definição das relações filogenéticas.

Os resultados da análise polifásica, segundo o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP), devem demonstrar coerência genotípica, fenotípica e filogenética entre os membros da suposta nova espécie, além da discriminação eficiente quando os mesmos são comparados com os táxons geneticamente relacionados. Sendo assim, pode-se dizer que a abordagem polifásica realizada neste trabalho foi promissora quanto à identificação de uma possível nova espécie para o gênero *Rhizobium*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J. L.; EGUIARTE, L. E.; SANTAMARIA, R. I.; BUSTOS, P.; VINUESA, P.; MARTINEZ-ROMERO, E.; DAVILA, G.; GONZALEZ, V. Genomic lineages of *Rhizobium etli* revealed by the extent of nucleotide polymorphisms and low recombination, **BMC Evolucioary Biology**, v. 11, p. 305, 2011.

ADEKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2095–2105, 2004.

ALEXANDRE, A.; LARANJO, M.; YOUNG, J. P. W.; OLIVEIRA, S. *dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2839-2849, 2008.

ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 135-140, 2006.

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae**: a source book of characteristics, uses, and nodulation. Wisconsin: University of Wisconsin Press, 1981. 812 p.

ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 91-120, 1994. p. 91-120.

ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; DE MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; YATES, R. J.; DILWORTH, M. J.; WILLEMS, A.; HOWIESON, J. G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga*

Itononidis sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2579-2588, 2012.

ARGUDO, M.; LITTLE, I.; SHEARER, R.; JOHNSON, N.; DIXON, R. TheNifL-NifA system: a multi domain transcriptional complex that integrates environmental signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 601-610, 2004.

BAIS, H. P.; PARK, S.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, p. 26-32, 2004.

BARBOSA FILHO, M. P.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F. Fontes, doses e parcelamento da adubação nitrogenada em cobertura para feijoeiro comum irrigado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p.69-76, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 521-577, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BATZLI, J. M.; GRAVES, W. R.; VAN BERKUM, P. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2137-2143, 1992.

BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: Current Perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, p. 616-639, 2014.

BINOTTI, F. F. S.; ARF, O.; ROMANINI JUNIOR, A.; FERNANDES, F. A.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Manejo do solo e da adubação nitrogenada na cultura de feijão de inverno e irrigado. **Bragantia**, v. 66, p.121-129, 2007.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BOUZAR, H.; JONES, J. B. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p.1023–6, 2001.

BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p. 119-130, 1999.

CABALLERO, S. V.; LIBARDI, P. L.; REICHARDT, K.; MATSUI, E.; VICTORIA, R. L. Utilização de fertilizante nitrogenado aplicado a uma cultura de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, p. 1031-1040, 1985.

CHARGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Genetic characterization of rhizobia isolated from Amazonas soils based on the technique of PCR-RFLP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 841-846, 2009.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5437-5447, 2000.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.

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

CHRISTENSEN, H., KUHNERT, P., OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Comparative phylogenies of the *housekeeping* genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1601–1609, 2004.

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**, v. 4, p. 80-95, 2000.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 840 – 862, 2004.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects the lactic acid bacteria as a test case. **Microbiology**, v. 149, p. 3507-3517, 2003.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 147-167, 2005.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v. 104, p. 410-433, 1970.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2013/2014: décimo segundo levantamento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>>, Acesso em fevereiro/2014.

COSTA, M. T. M.; MONDO, V. H. V.; FERREIRA, E. P. B. F.; FAGERIA, N. K. Fixação biológica de nitrogênio e efeitos no potencial fisiológico de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS, 7., 2013, Santo Antônio de Goiás. **Coletâneas dos resumos apresentados...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. p. 37.

COSTECHAREYRE, D.; RHOUMA, A.; LAVIRE, C.; PORTIER, P.; CHAPULLIOT, D.; BERTOLLA, F.; BOUBAKER, A.; DESSAUX, Y.; NESME, X. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 862–872, 2010.

CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, p. 389-395, 1998.

CROSA, J. H.; BRENNER, D. J., FALKOW, S. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacteria and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. **Journal of Bacteriology**, v. 115, p. 904-911, 1973.

DAI, J.; LIU, X.; WANG, Y. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Caragana microphylla* growing in desert soil in Ningxia, China. **Genetic and Molecular Research**, v. 11, p. 2683-2693, 2012.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, A. R.; DELAMUTA, J. R. M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaensis* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3222-9, 2014.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4167-73. 2013.

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

DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL E.; FROSTEGÅRD, A. Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* clade nodulating *Acacia* species and *Sesbania sesban* trees in southern regions of Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 216–226, 2011.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILHO, 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342-3351, 2013.

DELLAGLIO, F.; FELIS G. E.; GERMOND, J. Should names reflect the evolution of bacterial species? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 279-81, 2004.

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

DOIGNON-BOURCIER, F., WILLEMS, A., COOPMAN, R., LAGUERRE, G., GILLIS, M., DE LAJUDIE, P. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene apacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3987-3997, 2000.

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

EÇA, L. P. M. Biologia molecular: apresentação de algumas técnicas utilizadas na biologia molecular. **Revinter**, p.145-155, 2004.

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

ELKAN, G. H. Taxonomy of the rhizobia. **Journal of Microbiology**. v. 38, p. 446-450, 1992.

ESTRELLA, M. J.; MUÑOZ, S.; SOTO, M. J.; RUIZ, O.; SANJUAN, J. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the

Salado River Basin (Argentina). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 1088–1098, 2008.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H.J. (Eds.) **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 1-42.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

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

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 20, n. 1, p. 49-54, 1996.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 35-59, 2009.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Revista de Ciência Agronômica**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The Archaea and the deeply branching phototrophic bacteria. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 427-446

GARRITY, G. M.; BRENNER, DON, J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (2005). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Volume 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. New York, New York: Springer.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use – Update on legume utilization. **Plant Physiol**, v. 131, 2003.

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

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GILLIS, M. P.; VANDAMME, P.; DE VOS, J. Y.; SWINGS KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 43-48.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 518-522, 2004.

GRANADA, C. E. Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus* spp. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. 2010. 70 f.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K. A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F. Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 3, p. 179-185, 2004.

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

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

HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; SEGOVIA, L.; ROJASJIMÉNEZ, K.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 703-706, 2004.

HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, p. 1591–1599, 2004.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. A fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 30. Recife, 2005. **Anais...** Recife: SBSCS/URFPE/Embrapa Solos, 2005. 30 pp. (CD Rom).

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 819-830, 1997.

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

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

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. D. S.; CHUEIRE, L. M. D. O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.)

Microrganismos de importância agrícola. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 9-89.

INDGE, B. Nitrogen cycle. **Biological Sciences Review**, Manchester, v. 13, p. 25-27, 2000.

JARVIS, B. D. W.; GILLIS, M.; DE LEY, J. Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 129-138, 1986.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.

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

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

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

KING, C. A.; PURCELL, B. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1389-1396, 2005.

KIRK, J.; BEAUDETTE, L.; HART, M.; MOUTOGLIS, P. Methods of studying soil microbial diversity, **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KOEDOEBOECZ, L.; HALBRITTER, A.; MOGYOROSSY, T.; KECSKES, M L. Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia in cropping areas under intensive and organic agriculture in Hungary. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 394-399, 2009.

KUYKENDALL, L. D. Order VI. Rhizobiales ord. nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. (Eds), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd edi., v. 2, The Proteobacteria, part C, The Alpha-, Beta-Delta-, and Epsilonproteobacteria, New York: Springer, 2005, p. 324.

KUYKENDALL, L. D.; ELKAN, G. H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.32, p.511-519, 1976.

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

LAEREMANS, T.; VANDERLEYDEN, J. Review: Infection and nodulation signaling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 14, p. 787-808, 1998.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LATIF, S.; KHAN, S.; NAVEED, M.; MUSTAFA, G.; BASHIR, T.; ANDMUMTAZ, A. S. The diversity of rhizobia, sinorhizobia and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 647–653, 2013.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. **Rhizobium and other N-fixing symbioses**. In: Encyclopedia of life science (ELS). John Wiley & Sons, Ltd., 2010.

LINDSTRÖM, K., ASERSE, A. A., MOUSAVI, S. A. Taxonomy and evolution of nitrogen-fixing organisms. In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. John Wiley & Sons, Inc, 2015.

LITCHMAN, E. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 13: p. 1560–1572, 2010.

LIU, X. Y.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X. Y.; ZAGAR, C.; XIA, L. G.; DONG, X.; WANG, Y. P. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 417–426, 2012.

LÓPEZ-GUERRERO, M. G.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ACOSTA, J. L.; MENDOZA-VARGAS, A.; ROGEL, M. A.; RAMÍREZ, M. A.; ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. **Plasmid**, v. 68, p. 149-58, 2012.

LÓPEZ-LÓPEZ, I.; COFRADES, S.; YAKAN, M. T.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Frozen storage characteristics of low-salt and low-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. **Food Research International**, v. 43, p. 1244-1254, 2010.

LU, Y. L.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; GUAN, S. H.; YAN, X. R.; CHEN, W. X. Genetic diversity and biogeography of rhizobia associated with *Caragana* species in three ecological regions of the China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 351-361, 2009.

LU, J.; KANG, I.; HE, X.; XU, D. Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 30, p. 5343-5353, 2011.

MAESTER, T. C.; PEREIRA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Caracterização molecular de espécies do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de *Lactuca sativa*. **Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética**, 2010.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

MANTELIN, S.; SAUX, M. F.; ZAKHIA, F.; BÉNA, G.; BONNEAU, S.; JEDER, H.; DE LAJUDIE, P.; CLEYET-MAREL, J. C. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. And *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 827–39, 2006).

MAIDAK, B. L.; LARSEN, N.; MCCAUGHEY, M. J.; OVERBEEK, R.; OLSEN, G. J.; FOGEL, K.; BLANDY, J.; WOESE, C. R. The ribosomal database project. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 3485-3487, 1994.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Feijão. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 07 mai. 2014

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

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

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

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

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

MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerancia de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do

Rio Grande do sul à temperatura de salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2. p. 160-168, 2007.

MELLONI, R.; MOREIRA, 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, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 235-246, 2006.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 59, p. 1–17, 2009.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-32, 2006.

MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 120-130, 2009

MENNA-PEREIRA, P. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MERCANTE, F. M.; TEIXEIRA, M. G.; ABBOUD, A. C. S.; FRANCO, A. A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. **Revista da Universidade Rural**, v. 21, p. 127-146, 1999.

MORAES, W. B. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiros tolerantes a seca. **Idesia**, v. 28, p. 61-68, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. Soil organisms in tropical ecosystems: a key role for Brazil in the global quest for the conservation and sustainable use of biodiversity. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. USA: Cabi publishing, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n.2, p. 74-99, 2010.

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

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

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=147700&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em 10 de Outubro de 2014.

NAKAGAWA, Y.; SAKANE, T.; YOKOTA, A. Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (Foster 1944), a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 16-22, 1996.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, A. J. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Nature Reviews**, v. 5, p. 566-576, 2004.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, A. J. Legume infection by *Rhizium leguminosarum*. **Nature Reviews**, v. 5, p. 566-576, 2004.

ON, S. L. W.; HOLMES, B. Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 923-926, 1991.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSEMBERG, E.; DE LONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). Chapter 11. **The Prokaryotes** - prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p.427-451.

PANDYA, M.; NARESH KUMAR, G.; RAJKUMAR, S. Invasion of rhizobial infection thread by non rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 58–65, 2013.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.

PÉREZ-RAMIREZ, N. O.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 289-296, 1998.

POLHIL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens: 1981. 446 p.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting, In: AKKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D.; BRUIJN, F. J. (Eds). **Molecular microbial ecology manual**, v. 1,2. p. 611-643, 1998.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; GARCÍA-FRAILE, P.; PEIX, A.; VALVERDE, A.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (5NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov., **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2484–2490, 2008.

RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; TRAPPEN, S. V.; SWINGS, J.; DE VOS, P.; BARBOSA, H. R.; THOMPSON, C. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; THOMPSON, F.L. An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.4, p. 394-399, 2011.

RECOURT, K.; VAN BRUSSEL, A. A.; DRIESSEN, A. J.; LUGTENBERG, B. J. Accumulation of a *nod* gene inducer, the flavonoid naringerin in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringerin. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 4370-4377, 1989.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. **Ecology**, Davis, v. 89, p. 2924-2934, 2008.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S. REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de micro-organismos do solo. Planaltina: EMBRAPA, 2002.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v.164, p. 740-748, 2013.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1180-1185, 2012.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v. 2, p. 51-69, 2009.

RODIÑO, A. P.; DE LA FUENTE M.; DE RON, A. M.; LEMA, M. J.; DREVON, J. J.; SANTALLA, M. Variation for nodulation and plant yield of common bean genotypes and environmental effects on genotype expression. **Plant and Soil**, v. 346, p. 349-361, 2011.

RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA. S. Rhizobial hitchhikers from down under: invasional meltdown in a plant–bacteria mutualism? **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 1611–1622, 2010.

RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA. S.; FAJARDO, S.; RUIZ-DÍEZ, B.; FERNA´NDEZ-PASCUAL, M. Differential effectiveness of novel and old legume rhizobia mutualisms: implications for invasion by exotic legumes. **Oecologia**, v. 170, p. 253–261, 2012.

ROMA-NETO, I. V.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 1291-1302, 2010.

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

SLY, L. I. Emendation of the Genus *Blastobacter* Zavarzin 1961 and Description of *Blastobacter natatorius* sp. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, p. 40–45, 1985.

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

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. S. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em

genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.

SANTOS, A. B.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F.; MELO, M. L. B. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.1265-1271, 2003.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B. (Org). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p.18-41.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 251)

SAOUDI, M. **Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus***. Mémoire de Magister. Mentouri University of Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Algérie, 2008.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gamma- proteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Beta-proteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. **Journal of Molecular Evolution**, v. 20, p. 2-15, 1984.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum*

sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4033-4050, 2005.

SINGH, B.; KAUER, R.; SINGH, K. Characterization of *Rhizobium* strains isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3671-3676, 2008.

SLEATOR, R. D. Phylogenetics. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 235–239, 2011.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

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

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

STRAININFO. Available at: <<http://www.straininfo.net>>. Acesso em 20 Jan 2014.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. (Eds.) **Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p.122-153.

STROSCHEIN, M. R. D. **Seleção de rizóbios e efeito do nitrogênio na simbiose com alfafa e cornichão**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed., Porto Alegre: Artemed, 2004. 719 p.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J. K.; REINHOLD-HUERK, B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 3655-3664, 2001.

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.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KAMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 249-266, 2010.

TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. W. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 309-319, 2000.

TURNER, S. L.; ZHANG, X. X.; LI, F. D.; YOUNG, J. P. W. What does a bacterial genome sequence represent? Misassignment of MAFF303099 to the clade *Mesorhizobium loti*. **Microbiology**, v. 148, p. 3330–3331, 2002.

VALÉRIO, C. R.; ANDRADE, M. J. B.; FERREIRA, D. F.; REZENDE, P. M. Resposta do feijoeiro comum a doses de nitrogênio no plantio e em cobertura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, p. 1560-1568, 2003.

VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2631-2637, 2006.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1985–1989, 2005.

VAN BERKUM, P.; FUHRMANN, J. J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally

transcribed spacer region sequence divergence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2165-2172, 2000.

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

VANDAMME, T.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, DE P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p. 297-360.

VELAZQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Rio Piedras, v. 72, p. 427-436, 1988.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, 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**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIANEZ JUNIOR, J. L. S. G. **Avaliação criteriosa das sequências dos genes *rrn*, *rpoB* e *gyrB* como ferramentas em taxonomia microbiana**. 2005. 69f. Monografia (Bacharel em Microbiologia e imunologia). Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WANG, F. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. F.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia spp.* in comparison with microsymbionts of *Acacia spp.* and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 502–517, 2006.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRU"PER, H. G. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463–464, 1987.

WEI, G.; CHEN, W.; ZHU, W.; CHEN, C.; YOUNG, J. P. W.; BONTEMPS, C. Invasive *Robinia pseudoacacia* in China is nodulated by *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* species that share similar nodulation genes with native American symbionts. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 320–328, 2009.

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

WERTZ, J. E., GOLDSTONE, C., GORDON, D. M.; RILEY, M. A. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, p. 1236–1248, 2003.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1, p. 3-14, 2006.

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

WILLEMS, A.; MUNIVE, A.; DELAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA–DNA hybridizations, **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 203–210, 2003.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

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

YANNI, Y. G.; RIZK, E. Y.; CARICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGARNBIDE, G. G.; de BRUJIN, F. J.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.

YOUNG, J. M. *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1711–1713, 2010.

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

of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89–103, 2001.

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

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

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p. 539-554, 2003.

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

ZILLI, J. E.; ALMEIDA, D. L.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. **Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 15 p.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonia**, v. 39. p. 749-758, 2009.