



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA TEREZINHA MOURA

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
NÓDULOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)  
CULTIVADOS EM SOLOS DO MATO GROSSO DO  
SUL, BRASIL**

---

Londrina  
2021

FERNANDA TEREZINHA MOURA

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
NÓDULOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)  
CULTIVADOS EM SOLOS DO MATO GROSSO DO  
SUL, BRASIL**

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

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria.

Londrina  
2021

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

F363 Moura, Fernanda.  
Biodiversidade de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados em solos do Mato Grosso do Sul, Brasil / Fernanda Moura. - Londrina, 2021.  
92 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Fixação biológica do nitrogênio - Tese. 2. Bactérias diazotróficas - Tese. 3. 16S RNAr - Tese. 4. Genes housekeeping - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

FERNANDA TEREZINHA MOURA

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
NÓDULOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)  
CULTIVADOS EM SOLOS DO MATO GROSSO DO  
SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA SOJA

---

Dr. Renan Augusto Ribeiro  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA SOJA

---

Dr<sup>a</sup>. Luisa Caroline Ferraz Helene  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA SOJA

Londrina, 01 de março de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por não me permitir desistir jamais, por guiar meus passos, me proteger e por me fazer entender que toda a dor, no final, valerá a pena.

À minha mãe, Marilene, dedico esse mestrado. A mulher mais forte e destemida que conheço, me mostrando, durante ao longo da vida, que com dedicação, força e amor, somos capazes de alcançar nossos objetivos e que jamais devemos abaixar a cabeça quando alguém nos diz o contrário. Te amo!

Ao Lucas Rodrigues Thomaz, por todo o amor, carinho, dedicação, paciência e ajuda durante o mestrado. Obrigada por ser meu apoio, confiante e por sempre acreditar em mim.

À minha orientadora Mariangela, por confiar e aceitar me orientar, por nos acolher como se fôssemos filhos, por sentir junto conosco as perdas, vitórias, alegrias e incertezas. Me faltam palavras para te agradecer por tudo que você fez por mim. Obrigada por todo o ensinamento transmitido durante o desenvolvimento deste trabalho. À você, minha eterna admiração e gratidão.

Ao pesquisador Marco Antônio Nogueira, por toda a ajuda durante esse período atípico, é muito bom saber que estamos em um lugar onde nos sentimos acolhidos por pessoas que admiramos, que nos fazem sentir que estamos em família, a quem podemos confiar, dividir nossas conquistas e derrotas. Minha eterna gratidão.

Aos funcionários: Eduara, Lígia, Renan e Rinaldo, e a pós-doutoranda, Jakeline Delamuta, que estavam sempre dispostos a ajudar, obrigada pela atenção, paciência, e ensinamentos compartilhados. Agradeço por ter feito parte de um laboratório tão acolhedor, vocês são inspiração para todos, obrigada por deixarem meus dias mais descontraídos e alegres.

À Dona Rosa e Natalice, pelas conversas, risadas, por compartilharem comigo suas aflições pessoais. Por cuidarem do nosso material de estudo e por cuidarem de nós. Vocês são pessoas de luz, que Deus as proteja sempre!

Ao Anderson Scherer, meu amigo de longa data, que mesmo longe está sempre preocupado comigo e com a minha mãe, amo você e tenho imensa gratidão por você ter me indicado.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Solos: Àghata,

Alisson, Ana Carolina, Ana Paolla, Amanda, Artur, Camila, Débora, Gabriel, Jhonatan, Leandro, Maria Clara, Mariana, Natalia, Paula, Rafaella e Thiago, pelas conversas, risadas, conselhos, experiências divididas e principalmente, pela amizade, sem vocês teria sido muito mais difícil, em especial à Fabiane Paulitsch, Flávia Blender, Milena Klepa, Paloma Libório e Vanessa Freitas por se disponibilizarem a ajudar nos experimentos, dando dicas, sugestões e por compartilharem seus conhecimentos, meu muito obrigada por não me impedirem de desistir.

À Luisa Helene por se disponibilizar em ajudar, dar dicas de como melhorar o desenvolvimento deste estudo, puxar minha orelha quando necessário e compartilhar comigo sua vasta experiência.

À Embrapa Soja, pela estrutura e materiais disponibilizados.

À Hévilyn Oliveira e Nicoli Prestes, por entenderem meus sumiços, serem pacientes, confidentes e por sempre terem uma palavra de conforto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, a todos os professores e funcionários meu muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade e apoio.

Aos colegas do mestrado, Cassiano, Gabriela, Isadora, Matheus, Nádia, Thaysa e Vitoria, pelo companheirismo durante as aulas, trabalhos e eventos, em especial à Pamela Isaely, por não me permitir desistir, tendo sempre palavras de conforto, e pela amizade, obrigada por tudo, sem você as coisas não seriam mais leves e divertidas.

À Capes e Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudos.

Á todos, que contribuíram direta ou indiretamente.

MOURA, Fernanda Terezinha. **Biodiversidade de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados em solos do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

Bactérias diazotróficas coletivamente chamadas de rizóbios podem se associar com leguminosas, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e formar estruturas especializadas nas raízes, denominadas de nódulos, onde ocorre a conversão do nitrogênio atmosférico em amônia, em um processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Contudo, a associação do feijoeiro com essas bactérias frequentemente apresenta baixa eficiência simbiótica. Apesar da importância da leguminosa, ainda é escasso o conhecimento sobre as espécies de rizóbios simbioses do feijoeiro no Brasil, bem como de sua eficiência em fixar nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e atividade nodulífera de rizóbios simbioses de feijoeiro provenientes de 14 municípios do Mato Grosso do Sul, Brasil, compreendendo os três biomas do estado, Mata Atlântica, Cerrados e Pantanal. Foram realizadas a caracterização morfofisiológica, análise de perfil genômico por BOX-PCR, sequenciamento e análise filogenética dos genes 16S RNAr e do gene *housekeeping glnII*. Na análise de BOX-PCR em 82 estirpes, foi verificada alta diversidade genética, com um nível de similaridade final de apenas 18,68%; considerando o nível de similaridade de 70%, foram observados 12 grupos e 36 estirpes ocupando posições isoladas. Na análise do gene 16S RNAr de 54 estirpes representantes dos grupos encontrados por BOX-PCR, foram identificados 10 gêneros, sendo 37 “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium*, sendo 09 no clado *R. etli*, 11 no clado *R. tropici*, 15 no gênero *Agrobacterium* spp., uma estirpe de *Bradyrhizobium* e uma de *Mesorhizobium*. As outras 17 estirpes não foram identificadas como rizóbios. Como o gene 16S RNAr é altamente conservado e, com frequência, incapaz de distinguir espécies intimamente relacionadas, prosseguiu-se com a análise do gene *glnII*, que foi bem sucedida em 34 estirpes e confirmou o posicionamento filogenético. De 37 estirpes de “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* avaliadas quanto à capacidade de fixação de nitrogênio, apenas 13 formaram nódulos, 06 do clado *R. etli*, 06 do clado *R. tropici* e uma de *Agrobacterium*; exceto por uma estirpe do clado *R. etli*, os nódulos foram eficientes em fixar nitrogênio. Os resultados obtidos indicam alta diversidade genética de bactérias capazes de nodular o feijoeiro no Estado do Mato Grosso do Sul, e que a promiscuidade da leguminosa, permitindo associações não eficientes, pode justificar as taxas baixas de contribuição do processo biológico na leguminosa, relatadas com frequência. Os resultados também confirmam o intrigante paradigma da função evolutiva da simbiose com o feijoeiro, altamente promíscua, capaz de associar com uma variedade de espécies de bactérias incapazes de reinfectar a leguminosa, ou que perdem facilmente a capacidade de nodular e fixar nitrogênio.

**Palavras-chave:** fixação biológica do nitrogênio; bactérias diazotróficas; BOX-PCR; 16S RNAr; genes *housekeeping*.

MOURA, Fernanda Terezinha. **Biodiversity of rhizobia symbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Mato Grosso do Sul, Brazil.** 2021. 91 f. Dissertation (Master in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Diazotrophic bacteria collectively called rhizobia can associate with legumes such as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and form specialized structures in the roots, called nodules, where the conversion of atmospheric nitrogen to ammonia occurs, in a process known as biological nitrogen fixation (BNF). However, the association of common bean with these bacteria often shows low symbiotic efficiency. Despite the importance of this legume, knowledge about the species of rhizobia symbionts of common bean in Brazil, as well as their efficiency in fixing nitrogen, is still scarce. The objective of this study was to evaluate the diversity and nodulation ability of rhizobia symbionts of common bean from 14 municipalities in Mato Grosso do Sul, Brazil, comprising the three biomes of the State, Atlantic Forest, Cerrados and Pantanal. For that, the morphophysiological characterization, genomic profile analysis by BOX-PCR, sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes and of the housekeeping *glnII* gene were performed. In the BOX-PCR analysis of 82 strains, high genetic diversity was verified, with a final similarity level of only 18.68%; considering the similarity level of 70%, 12 groups and 36 strains occupying isolated positions were observed. In the 16S rRNA gene analysis of 54 strains representative of the BOX-PCR groups, 10 genera were identified, being 37 of "classic rhizobia" and *Agrobacterium*, with 09 in the *R. etli* clade, 11 in the *R. tropici* clade, 15 in the *Agrobacterium* spp. genus, one *Bradyrhizobium* and one *Mesorhizobium* strain. The other 17 strains were not identified as rhizobia. As the 16S rRNA gene is highly conserved and often unable to distinguish closely related species, we proceeded with the analysis of the *glnII* gene, which was successful in 34 strains and confirmed their phylogenetic position. Of the 37 strains classified as "classic rhizobia" and *Agrobacterium* that were evaluated for nitrogen fixation capacity, only 13 formed nodules, 06 of the *R. etli* clade, 06 of the *R. tropici* clade and one of *Agrobacterium*; except for one strain of the *R. etli* clade, the nodules were efficient in fixing nitrogen. The results obtained indicate high genetic diversity of bacteria capable of nodulating common bean in the State of Mato Grosso do Sul, and that the promiscuity of the legume, allowing inefficient associations, may justify the low rates of contribution of the biological process in the legume frequently reported. The results also confirm the intriguing paradigm of the evolutionary function of the symbiosis with common bean, highly promiscuous, capable of associating with a variety of bacterial species that are incapable of re-infecting the legume, or that easily lose the ability to nodulate and fix nitrogen.

**Keywords:** biological nitrogen fixation; diazotrophic bacteria; BOX-PCR; 16S rRNA; housekeeping genes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Processo de desenvolvimento dos nódulos em raízes de leguminosas. .... 24
- Figura 2** - Localização dos municípios e biomas nos quais as amostras de solos foram coletadas no Estado do Mato Grosso do Sul ..... 35
- Figura 3** - Papel germiteste umedecido acomodando 50 sementes de feijão da variedade Esteio..... 45
- Figura 4** - Inoculação de 1 mL das estirpes em radículas de feijoeiro, realizado em cinco repetições. .... 45
- Figura 5** - Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard com 2% de tolerância, utilizando o *software* Bionumerics 7.6. Os números em parênteses representam os municípios de isolamento no estado de Mato Grosso do Sul..... 47
- Figura 6** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (942 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Agrobacterium* (Máxima Verossimilhança, modelo Kimura-2-parâmetros (K2), com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas. .... 51
- Figura 7** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (944 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Rhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G+I, com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas..... 52
- Figura 8** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene

*housekeeping glnII* (337 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Agrobacterium* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G, com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica cinco substituições por 100 posições nucleotídicas..... 56

**Figura 9** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *housekeeping glnII* (346 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Rhizobium* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei (TN93), com distribuição G + I, com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas..... 58

**Figura 10** - Nódulos formados em diferentes estirpes e interior do nódulo com coloração branca e rosa. .... 65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Municípios e biomas de isolamento das estirpes no estado de Mato Grosso do Sul e identificação das estirpes (CNPSo) utilizadas neste estudo.....	36
<b>Tabela 2</b> - Números de acesso das sequências do gene 16S RNAr utilizadas neste estudo.....	49
<b>Tabela 3</b> - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as espécies relacionadas baseado na análise filogenética do gene 16S RNAr. ....	53
<b>Tabela 4</b> - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as estirpes relacionadas do gênero <i>Agrobacterium</i> baseado na análise filogenética do gene <i>housekeeping glnII</i> . ....	57
<b>Tabela 5</b> - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as espécies relacionadas do gênero <i>Rhizobium</i> baseado na análise filogenética do gene <i>housekeeping glnII</i> . ....	59
<b>Tabela 6</b> - Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de <i>P. vulgaris</i> .....	61
<b>Tabela 7</b> - Capacidade de nodulação e eficiência das estirpes em estudo em simbiose com <i>P. vulgaris</i> .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI	Average Nucleotide Identity
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CNPSo	Centro Nacional de Pesquisa de Soja
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
IN	Identidade Nucleotídica
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis
MS	Mato Grosso do Sul
N	Nitrogênio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean
VC	Vermelho Congo
YM	Yeast Mannitol
YMA	Yeast Mannitol Agar

# Sumário

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	18
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
3.1.	IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO .....	19
3.2.	BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO E O PROCESSO DE NODULAÇÃO .....	22
3.3.	TAXONOMIA BACTERIANA .....	25
3.4.	DIVERSIDADE E TAXONOMIA POLIFÁSICA DE RIZÓBIOS.....	27
3.5.	MÉTODOS DE ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA .....	30
3.5.1.	BOX-PCR <i>Fingerprinting</i> .....	30
3.5.2.	Filogenia do gene 16S RNAr e genes <i>housekeeping</i> .....	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1.	ESTIRPES UTILIZADAS.....	34
4.2.	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	37
4.2.1.	Extração de DNA Total.....	37
4.2.2.	Reação de BOX-PCR <i>Fingerprinting</i> .....	37
4.2.3.	Amplificação do gene ribossomal 16S .....	38
4.2.4.	Amplificação do gene <i>housekeeping glnII</i> .....	38
4.2.5.	Sequenciamento e análise dos genes 16S RNAr e <i>glnII</i> .....	39
4.3.	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA.....	40
4.3.1.	Manifestação de Crescimento .....	41
4.3.2.	Diâmetro das Colônias .....	41
4.3.3.	Produção de Muco .....	41
4.3.4.	Alteração do pH do meio.....	42
4.3.5.	Forma, Borda, Superfície e Elevação das Colônias .....	42

4.3.6.	Consistência da Massa de Crescimento .....	42
4.3.7.	Detalhes Ópticos .....	42
4.3.8.	Cromogênese em YMA contendo azul de bromotimol e vermelho Congo.....	42
4.4.	CAPACIDADE DE NODULAÇÃO E EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	43
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1.	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	46
5.1.1.	BOX- <i>Fingerprinting</i> .....	46
5.2.	CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA.....	48
5.2.1.	Análises do gene 16S RNAr.....	48
5.2.2.	Análise filogenética do gene <i>housekeeping glnII</i> .....	54
5.3.	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA.....	60
5.4.	CAPACIDADE DE NODULAÇÃO E EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	63
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>88</b>
	APÊNDICE A - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (953 pb) da estirpe <i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 3435 (em negrito) e espécies do gênero <i>Bradyrhizobium</i> (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com 1000 repetições <i>bootstrap</i> ). <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 foi usado como <i>outgroup</i> . Valores de <i>bootstrap</i> superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas.....	89

<p>APÊNDICE B - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (968 pb) da estirpe <i>Mesorhizobium</i> sp. CNPSo 3975 (em negrito) e espécies do gênero <i>Mesorhizobium</i> (Máxima Verossimilhança, modelo Kimura-2-parâmetros (K2), com distribuição G, com 1000 repetições <i>bootstrap</i>). <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 foi usado como <i>outgroup</i>. Valores de <i>bootstrap</i> superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas .....</p>	90
<p>APÊNDICE C - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene <i>housekeeping glnII</i> (504 pb) da estirpe <i>Bradyrhizobium</i> sp. 3435 (em negrito) e espécies do gênero <i>Bradyrhizobium</i> (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-Nei (TN93), com distribuição G, com 1000 repetições <i>bootstrap</i>). <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 foi usado como <i>outgroup</i>. Valores de <i>bootstrap</i> superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas .....</p>	91
<p>APÊNDICE D - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene <i>housekeeping glnII</i> (516 pb) da estirpe <i>Mesorhizobium</i> sp. CNPSo 3975 (em negrito) e espécies do gênero <i>Mesorhizobium</i> (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G, com 1000 repetições <i>bootstrap</i>) utilizando o software Mega 7.0. <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 foi usado como <i>outgroup</i>. Valores de <i>bootstrap</i> superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas .....</p>	92

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente difundido em todo o território brasileiro em diferentes condições e sistemas de produção, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. O feijoeiro é uma leguminosa que possui grande importância nutritiva, econômica e social e é um componente fundamental na dieta alimentar populacional por fornecer nutrientes essenciais como proteínas, ferro, zinco, fibras e carboidratos. Embora o cultivo do feijoeiro seja amplamente difundido no país, sua produtividade é baixa, sendo uma das principais razões a alta exigência nutricional, principalmente de nitrogênio (N) e fósforo (P), o que também encarece a produção.

Por estar envolvido em diversos processos metabólicos, o N é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro. Em termos agrícolas, as duas principais fontes de fornecimento do N são os fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica do nitrogênio (FBN), sendo esta a principal via de entrada de N nos ecossistemas, além de representar uma alternativa mais econômica e sustentável, comparada às outras fontes.

A FBN é realizada por microrganismos que habitam prioritariamente o solo, capazes de romper a tripla ligação entre dois átomos de N e disponibilizá-lo em formas assimiláveis para as plantas. Esses microrganismos podem ser de vida livre, associativos, endofíticos ou simbiotes; os simbiotes são coletivamente denominados de rizóbios. Os rizóbios podem se associar em diferentes graus de especificidade com diversas plantas, principalmente com leguminosas da família Fabaceae, formando estruturas especializadas nas raízes e nos caules, os nódulos, nos quais o processo de conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em NH<sub>3</sub> ocorre, devido à atividade do complexo enzimático denominado nitrogenase. O feijoeiro é reconhecido por ser uma planta que estabelece simbiose promíscua, sendo capaz de se associar com uma grande variedade de espécies de rizóbios, contudo, várias delas com baixa eficiência de FBN.

Estudos que visem a caracterização de rizóbios são de grande importância para o entendimento de sua origem, evolução, necessidades metabólicas, comportamento simbiótico, entre outras propriedades que indiquem a riqueza e o

potencial biotecnológico da diversidade bacteriana ainda pouco explorada.

A taxonomia é a ciência encarregada de identificar, classificar e nomear seres vivos, sendo fundamental para a classificação adequada de microrganismos de interesse biotecnológico. Atualmente, a taxonomia de bactérias é estudada através da abordagem polifásica, reunindo análises fenotípicas, genéticas e filogenéticas que, em conjunto, indicarão a posição taxonômica dos procariotos.

Nos últimos anos, estudos taxonômicos de rizóbios que nodulam o feijoeiro vêm ganhando maior notoriedade, revelando um crescente interesse de grupos de pesquisas e resultando na descrição de diversas novas espécies. Apesar disso, ainda há poucos estudos sobre a diversidade microbiana em alguns biomas brasileiros.

O Mato Grosso do Sul (MS) é reconhecido como um estado biodiverso, tanto em plantas e animais, como provavelmente em sua microbiota, devido à existência de três biomas considerados *hotspot* em biodiversidade, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica, mas ainda há poucos estudos sobre a diversidade microbiana na região. Nesse contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar a diversidade de bactérias capturadas por feijoeiro a partir de solos de 14 municípios do Mato Grosso do Sul, compreendendo os três biomas.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro cultivado em solos do Mato Grosso do Sul.

### 2.2. Objetivos Específicos

Em uma coleção de culturas composta por 82 bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro provenientes de solos de 14 municípios do Mato Grosso do Sul:

- a) Avaliar a diversidade genética através da técnica de BOX-PCR;
- b) Identificar as estirpes em nível de gênero e acessar a relação filogenética das espécies mais próximas com base na análise do gene ribossomal 16S;
- c) Refinar a identificação das estirpes classificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* pela análise do gene *housekeeping glnII*;
- d) Realizar a caracterização morfofisiológica e verificar o desempenho simbiótico de estirpes representativas dos principais grupos de “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* encontrados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Importância do Nitrogênio e a Fixação Biológica do Nitrogênio

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, em razão de sua relação com a composição da matéria orgânica, participando na formação de hormônios, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, bases nitrogenadas, clorofila e outras moléculas fundamentais para os processos biológicos; desse modo, sua limitação afeta diretamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997; HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a,b).

Embora o N esteja presente em grande quantidade na atmosfera, compondo aproximadamente 80% do volume total, ele não é metabolicamente assimilável pela maioria dos organismos vivos. Isso acontece porque o nitrogênio atmosférico encontra-se na forma de  $N_2$ , uma molécula de grande estabilidade devido à presença de uma forte ligação tripla entre dois átomos de N ( $N \equiv N$ ), necessitando que a tripla ligação seja quebrada e o nitrogênio transformado em uma forma assimilável pelos vegetais (RASCIO; LA ROCCA, 2013; TAIZ *et al.*, 2017).

O N necessário às plantas pode ser obtido a partir de quatro principais fontes: (i) o solo, associado à matéria orgânica; (ii) pela fixação não biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; (iii) pelos fertilizantes nitrogenados, e (iv) pela fixação biológica do nitrogênio (FBN).

De acordo com Hungria; Mendes; Mercante (2013a), a disponibilização de N presente na matéria orgânica do solo é limitada, podendo ser esgotada rapidamente após alguns cultivos; além disso, as condições de umidade e temperaturas elevadas, como as que ocorrem no Brasil, aceleram o processo de decomposição da matéria orgânica, resultando em solos pobres em nitrogênio.

A fixação não biológica decorrente de processos naturais é uma fonte que contribui com uma porcentagem pequena de nitrogênio, em torno de apenas 10%. Portanto, os fertilizantes nitrogenados e o processo de FBN constituem as principais fontes de N para as plantas (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

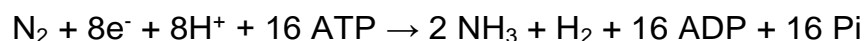
Os fertilizantes nitrogenados representam a forma mais fácil de assimilação pelas plantas, e são obtidos pelo processo químico industrial de conversão do  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ), também chamado de Haber-Bosch. Contudo, o processo é bastante dispendioso, pois para a sua síntese são necessários um catalisador contendo ferro, hidrogênio derivado de petróleo, altas temperaturas (300 a 600°C) e pressões (200 a 800 atm). Além do alto custo, menos de 50% do N aplicado é aproveitado pelas plantas, sendo o restante perdido nos processos de desnitrificação, volatilização e lixiviação, ocasionando poluição das águas superficiais e subterrâneas e emissão de gases do efeito estufa, além destes fatores, o processo utiliza petróleo, uma fonte de energia não renovável como matéria prima (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; KASCHUK; HUNGRIA, 2017).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) representa o principal meio de incorporação de N à biosfera, sendo um processo realizado por microrganismos que habitam o solo, e que possuem uma enzima denominada nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação do  $N_2$  atmosférico, reduzindo-o a amônia ( $NH_3$ ) e, então, transformando-o em formas nitrogenadas que as plantas conseguem assimilar. A FBN é realizada por um grupo de procariotos, incluindo bactérias e arqueias, que também são denominadas diazotróficas (FERGUSON *et al.*, 2010; RASCIO; LA ROCCA, 2013).

A enzima nitrogenase é composta por duas subunidades proteicas capazes de transportar elétrons para que a redução ocorra, correspondendo à dinitrogenase redutase (Fe-proteína) e à dinitrogenase (MoFe-proteína). Além da nitrogenase tradicional, que contém molibdênio (Mo) e ferro (Fe) são conhecidos mais dois tipos de nitrogenase: (i) a nitrogenase em que vanádio (V) substitui o molibdênio (Mo); e a (ii) nitrogenase que só contém ferro (Fe) (RAYMOND *et al.*, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2020).

O processo de redução do  $N_2$  a  $NH_3$  envolve, ainda, uma terceira molécula que auxilia no processo, a ferredoxina ou flavodoxina, que na sua forma reduzida transfere elétrons para a dinitrogenase redutase, iniciando a reação. A seguir, a dinitrogenase redutase (Fe-proteína) os doa para a dinitrogenase (MoFe-proteína), a transferência acontece de um elétron por vez, sendo necessário seis eventos de transferência para que ocorra a redução completa da molécula de  $N_2$ . No entanto, a dinitrogenase também reconhece os prótons (H) na célula, de modo que, para cada  $N_2$  reduzido,

dois íons H são reduzidos a H<sub>2</sub>, sendo efetivamente consumidos 8 elétrons, como pode ser observado na estequiometria da reação:



A NH<sub>3</sub> sintetizada é incorporada em íons hidrogênios (H<sup>+</sup>), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo então a transformação em íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Contudo, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em altas concentrações se torna tóxico, sendo rapidamente exportado para as células da planta, onde é convertido em formas orgânicas assimiláveis (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; RASCIO; LA ROCCA, 2013; HOFFMAN *et al.*, 2014; TAIZ *et al.*, 2017; VERMA *et al.*, 2020).

A FBN representa um processo importante em sistemas agrícolas, podendo diminuir a necessidade de aplicação dos fertilizantes nitrogenados, visto que pode suprir a demanda de N de diversas culturas, diminuindo o impacto dos fertilizantes na poluição das águas, evitando a lixiviação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e mitigando as emissões de gases de efeito estufa (RASCIO; LA ROCCA, 2013; KASCHUK; HUNGRIA, 2017). Estima-se que 65% do aporte de N na Terra provêm da FBN, sendo considerado o principal processo para a vida após a fotossíntese (ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013; KASCHUK; HUNGRIA, 2017).

A estimativa para a produção de feijão na safra 2020/2021 no Brasil é de 3,12 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Houve um decréscimo, quando comparado com a safra de 2019/2020 (3,22 milhões de toneladas). Apesar do feijoeiro integrar o grupo das três principais leguminosas cultivadas mundialmente, juntamente com a soja (*Glycine max* L. (Merr.)) e o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), quando comparado com a soja, a cultura apresenta baixa eficiência simbiótica. Essa baixa eficiência parece estar relacionada a uma série de fatores referentes à bactéria, à planta e ao meio ambiente, por exemplo, quando inoculada, a simbiose feijoeiro-rizóbio apresenta maior sensibilidade a estresses ambientais, dificultando a fixação de N<sub>2</sub>. Outro fator importante é a promiscuidade do feijoeiro, que nodula com uma diversidade de rizóbios, alguns ineficientes ou pouco eficientes em FBN (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013b; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

A aplicação de inoculantes contendo estirpes bacterianas selecionadas e com alta capacidade de FBN representa uma tecnologia bem sucedida, principalmente entre as leguminosas. No entanto, por conta da promiscuidade do *P. vulgaris*, é de grande importância conduzir estudos que analisem a diversidade e eficiência de

rizóbios, visando incrementar o processo de FBN, resultando em maior suprimento de N a um baixo custo para o agricultor. Entretanto, a seleção de estirpes elite para a produção de inoculantes, com o intuito de alcançar uma redução significativa na adubação mineral nitrogenada ainda representa um grande desafio para a cultura do feijoeiro (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

Atualmente as estirpes de rizóbio autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro comum no Brasil são pertencentes às espécies *Rhizobium tropici*, estirpes CIAT 899 (= SEMIA 4077) e H12 (= SEMIA 4088) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (= SEMIA 4080), isoladas na Colômbia, Distrito Federal-Brasil e Paraná-Brasil, respectivamente. Cabe salientar que as duas pertencem ao clado *R. tropici* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013; GOMES; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015). Elas são utilizadas em inoculantes pois, pertencendo ao clado *R. tropici*, são geneticamente mais estáveis, eficientes no processo de FBN, apresentam alta tolerância a elevadas temperaturas, e à acidez do solo e maior competitividade nos solos brasileiros (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013b; GOMES; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015; MERCANTE; OTSUBO; BRITO, 2017; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

### 3.2. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio e o Processo de Nodulação

O solo abriga uma vasta diversidade de microrganismos fixadores de nitrogênio, que podem ser nativos ou naturalizados. Quanto a sua relação com espécies vegetais, podem se associar em diferentes graus com base na intimidade e interdependência entre bactéria e planta, podendo ser classificadas em quatro grupos: vida livre, associativas, endofíticas e simbióticas (MUS *et al.*, 2016; KASCHUK; HUNGRIA, 2017).

As bactérias de vida livre fixam o N<sub>2</sub> para uso próprio, sem a necessidade de outro organismo, utilizando a energia disponível no ambiente (ex.: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*); as associativas ligam-se às raízes de plantas sem invadir suas células (ex.: *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp.); as endofíticas colonizam os tecidos internos das plantas sem provocar alterações estruturais (ex.: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp. e algumas estirpes de *Azospirillum brasilensis*); e as simbióticas provocam mudanças estruturais e funcionais na planta hospedeira e na bactéria,

promovendo a formação de novos órgãos em raízes e caules, os nódulos (coletivamente denominados rizóbios, mas que incluem Alfaproteobacteria, como *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp. e Betaproteobacteria, como *Paraburkholderia*) (MONTEIRO *et al.*, 2012; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013; MUS *et al.*, 2016; KASCHUK; HUNGRIA, 2017).

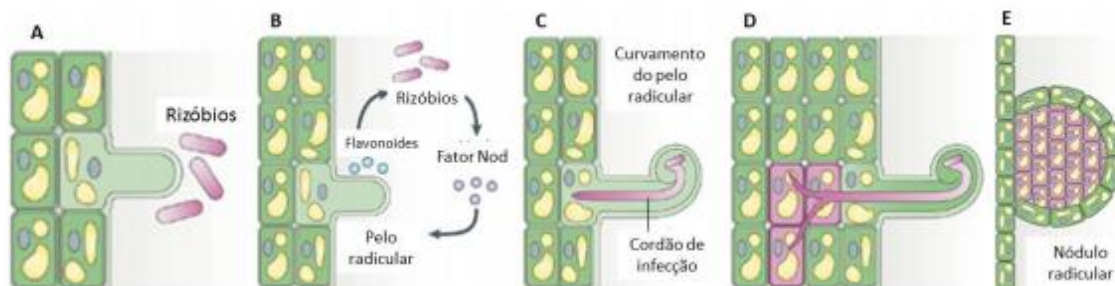
Os rizóbios são capazes de fixar o N<sub>2</sub> atmosférico, quando estas se encontram em simbiose com plantas, geralmente da família Leguminosae (Fabaceae). Dentre as associações com bactérias diazotróficas, a interação rizóbio-leguminosa é a que fornece o maior aporte de N via FBN aos ecossistemas terrestres, exercendo um papel ecológico essencial na ciclagem de N (OLDROYD; DOWNIE, 2008; HAAG *et al.*, 2013).

O estabelecimento da simbiose entre bactéria e planta hospedeira é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, tendo por objetivo perceber, traduzir e responder a sinais moleculares (BROUGHTON; JABBOURI; PERRET, 2000; KOBAYASHI; BROUGHTON, 2008). Para isso, as bactérias precisam dispor de genes envolvidos na síntese e exportação dos lipo-quito-oligossacarídeos (Fatores Nod), que são os genes *nod*, *nol* e *noe*, e na síntese e atividade do complexo nitrogenase, os genes *nif* e *fix* (REMIGI *et al.*, 2016).

O processo começa quando os rizóbios são atraídos por sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira, responsáveis por atrair as bactérias em direção às raízes das plantas por quimiotaxia, compreendendo uma variedade de moléculas (HUNGRIA *et al.*, 1994; KOBAYASHI; BROUGHTON, 2008; MUS *et al.*, 2016; TAIZ *et al.*, 2017).

Na etapa seguinte, sinais moleculares exsudados pela planta hospedeira, predominantemente flavonoides, induzem à transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*), conduzindo à síntese e secreção dos fatores Nod. Os lipo-quito-oligossacarídeos são secretados pelos rizóbios, sendo determinantes para o processo de reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira (GAGE, 2004; OLDROYD; DOWNIE, 2008) (Figura 1).

**Figura 1** - Processo de desenvolvimento dos nódulos em raízes de leguminosas.



(A) Os rizóbios são atraídos por sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira, desencadeando uma série de eventos; (B) os flavonoides liberados pelas raízes das leguminosas induzem a síntese dos fatores Nod, os rizóbios se multiplicam, colonizando os pelos radiculares; (C) a ligação do rizóbio ao pelo radicular promove o enrolamento dos pelos ao redor da bactéria, permitindo sua entrada nas raízes, ocasionando a origem do cordão de infecção; (D) o cordão de infecção cresce em direção às células corticais da raiz, chamado de nódulo primário; (E) o cordão de infecção se divide nos primórdios dos nódulos, as bactérias invadem as células das plantas, transformando-se em bacteroides.

**Fonte:** A própria autora (adaptado de DEAKIN; BROUGHTON, 2009)

Quando atraídas para a rizosfera da planta, as bactérias se multiplicam e colonizam os pelos (tricomos) radiculares. A ligação do rizóbio ao pelo radicular estimula o encurvamento em torno da bactéria, o que ocasiona a degradação de uma porção da parede celular do tricoma, promovendo a entrada das bactérias nas raízes, dando origem ao cordão de infecção (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Os cordões de infecção são invaginações produzidas nas plantas, capazes de cruzar os limites celulares, permitindo a invasão bacteriana nas células corticais via endocitose. Depois de formado, o cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz, que recebe o nome de nódulo primário, e as bactérias presentes no interior do cordão continuam se multiplicando. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção se ramifica para as células vegetais. A partir do estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias, presentes nas células radiculares hospedeira param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem alterações bioquímicas e fisiológicas, se diferenciando em estruturas especializadas no processo de FBN, denominadas bacteroides. Os bacteroides ficam presentes dentro de uma organela vegetal única, a qual é delimitada por uma membrana derivada da planta que controla a troca de nutrientes entre os simbiossiontes (GAGE, 2004; FERGUSON

*et al.*, 2010; MUS *et al.*, 2016; TAIZ *et al.*, 2017).

Para que a FBN ocorra a planta precisa fornecer um ambiente com baixa concentração de oxigênio ( $O_2$ ), pois o complexo nitrogenase é altamente sensível a essa molécula, que inativa irreversivelmente a enzima. Os nódulos contêm uma alta concentração da proteína leghemoglobina, que transporta o  $O_2$  para o microssimbionte; por ter uma alta afinidade com o  $O_2$ , a leghemoglobina age como um tampão, mantendo a concentração de  $O_2$  baixa, mas ao mesmo tempo, provendo  $O_2$  necessário ao microrganismo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; GAGE, 2004; OTT *et al.*, 2005; HAAG *et al.*, 2013). Quando a FBN está ativa o interior dos nódulos apresenta uma coloração rósea (avermelhada) indicando funcionalidade da leghemoglobina, a cor branca ou verde indica que não há atividade, ou seja, não há fixação de  $N_2$ , já a cor cinza indica nódulos senescentes, com perda de funcionalidade da leghemoglobina (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; PEIX *et al.*, 2015).

Para que uma relação de simbiose possa ocorrer entre a planta hospedeira e rizóbio, Maunoury e colaboradores (2008) destacam a necessidade de três principais eventos: (i) infecção intracelular do microssimbionte na célula hospedeira; (ii) organogênese do nódulo, ou seja, a formação dos nódulos; e (iii) o processo de fixação de  $N_2$ . A infecção e a organogênese ocorrem simultaneamente e a fixação de  $N_2$  ocorre após a organogênese dos nódulos estar completa e somente se a infecção bacteriana for bem sucedida (TAIZ *et al.*, 2017).

### 3.3. Taxonomia Bacteriana

A taxonomia bacteriana é a ciência que tem por objetivo classificar, nomear e identificar microrganismos. A classificação agrupa os organismos de maneira ordenada, alocando-os em grupos (táxons), com base em suas similaridades ou relações, e a nomenclatura fornece nomes aos grupos taxonômicos. No caso de bactérias, a taxonomia deve seguir as regras internacionais estabelecidas pelo “Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias”; e a identificação determina se um isolado pertence a um táxon conhecido ou se constitui um novo (LAPAGE *et al.*, 1992; VANDAMME *et al.*, 1996; BRENNER; STALEY; KRIEG; 2005). Kämpfer e Glaeser (2012) enfatizam que o principal objetivo da taxonomia é fornecer uma classificação que possa ser usada para uma ampla variedade de objetivos.

A princípio, a classificação de procariontes era baseada somente em características fenotípicas, como forma, coloração das colônias e tempo de crescimento, seguida pela análise de propriedades fisiológicas, como a capacidade de utilização de fontes de carbonos (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001; CHUEIRE *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2010; THOMPSON *et al.*, 2013). Neste contexto, todos os rizóbios capazes de formar nódulos em leguminosas eram classificados em um único gênero, *Rhizobium* (VIEIRA, 2007).

A seguir, a classificação dos rizóbios passou a ser baseada na capacidade de nodulação entre as linhagens de microrganismos com as leguminosas hospedeiras, por que acreditava-se que cada espécie de *Rhizobium* era capaz de nodular determinada espécie de leguminosa, dando origem ao termo inoculação cruzada. A partir desse conceito, seis espécies foram reconhecidas, *Rhizobium leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* e *R. lupini*, nodulando ervilha (*Pisum sativum*), trevos (*Trifolium* spp.), feijoeiro, alfalfa (*Medicago sativa*), soja e tremoços (*Lupinus* spp.), respectivamente. Com o avanço dos estudos, tornou-se claro que os rizóbios eram um grupo de bactérias bastante diverso, tanto em espectro de hospedeiros como em características fisiológicas, e que havia algum tipo de correlação entre essas duas propriedades (STRALIOTTO, 2005; PEIX *et al.*, 2015; VELÁZQUEZ *et al.*, 2017).

Em 1982, Jordan reclassificou algumas espécies de rizóbios, separando-as com base no crescimento em meio de cultura específico contendo manitol como fonte de carbono, dois grupos foram formados: as de crescimento rápido foram agrupadas no gênero *Rhizobium* e as de crescimento lento no gênero *Bradyrhizobium* (*bradus* = lento). O tempo de crescimento é uma característica importante na diferenciação preliminar dessas bactérias. Inicialmente, considerava-se como rizóbio de crescimento rápido as espécies que demoravam de 2 a 3 dias para apresentar colônias isoladas e, em tempos superiores a isso, eram consideradas de crescimento lento. Atualmente, existem espécies que apresentam crescimento intermediário (4 a 5 dias) e as de crescimento muito lento, que demoram mais de 10 dias para que se possa observar o aparecimento de colônias (STRALIOTTO, 2005).

A mudança mais relevante para a taxonomia bacteriana aconteceu em 1977, quando Woese & Fox propuseram uma nova classificação de procariontes, com base em sequências da pequena subunidade do RNA ribossômico (16

RNAr). A utilização das técnicas moleculares revolucionou os estudos de taxonomia, tornando-se ferramentas essenciais na classificação e identificação bacteriana. Entretanto, foi apenas em 1991 que a primeira espécie com base no sequenciamento parcial do gene 16S RNAr foi descrita (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; VELÁZQUEZ *et al.*, 2017).

Atualmente, a caracterização polifásica é a abordagem mais aceita na taxonomia, e foi introduzida por Colwell (1970), integrando diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genotípicas e filogenéticas) para obtenção da correta posição taxonômica de uma estirpe ou de um grupo de estirpes (VANDAMME *et al.*, 1996; THOMPSON *et al.*, 2013).

#### 3.4. Diversidade e Taxonomia Polifásica de Rizóbios

A classificação apropriada de um microrganismo necessita seguir rigorosamente a protocolos estabelecidos, a fim de evitar erros ou dúvidas durante o seu desenvolvimento; por isso são utilizadas técnicas que envolvem a caracterização fenotípica, genotípica e filogenética.

As características fenotípicas são definidas como “características observáveis” e advêm da expressão de genes de um organismo, podendo ser observadas com análises morfológicas, fisiológicas, sorológicas e quimiotaxonômicas, sendo utilizadas principalmente como um meio de complementariedade, dando maior sustentabilidade a outros dados obtidos. As características genotípicas, são advindas do material genético, o genoma, e são avaliadas através de técnicas como quantificação do conteúdo G+C, hibridação DNA-DNA, padrões de restrição do DNA (RFLP, PFGE), sequenciamento de genes e ampliações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase). Por fim, a filogenia estuda a história evolutiva, utilizando dados moleculares capazes de inferir as relações evolutivas entre indivíduos (TINDALL *et al.*, 2010; MOORE *et al.*, 2010; KÄMPFER; GLAESER 2012; ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2015; CHUN *et al.*, 2018).

Para determinar uma espécie bacteriana, é estabelecido que as estirpes em estudo precisam apresentar 70% ou mais de similaridade com a estirpe-tipo na análise de hibridação DNA-DNA (HDD) e 5°C ou menos nos valores de  $\Delta T_m$  (diferença na temperatura de *melting*, ou seja diferença na temperatura de desnaturação da dupla fita) (WAYNE *et al.*, 1987).

A técnica de hibridação DNA-DNA (HDD), que mede o grau de similaridade entre dois genomas diferentes, apesar de ter sido bastante utilizada para a descrição de novas espécies, é laboriosa, tem custo elevado e é acessível em poucos laboratórios, portanto, caiu em desuso. Atualmente, os métodos que utilizam sequenciamento completo do genoma têm se tornado uma ferramenta chave na taxonomia bacteriana, por apresentarem confiabilidade e reprodutibilidade, além de fornecerem dados altamente informativos. A identidade média dos nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity* – ANI) e Hibridação DNA-DNA digital (HDDd) têm sido as ferramentas digitais amplamente usadas para a comparar o isolado em estudo com estirpes-tipo das espécies relacionadas (CHUN *et al.*, 2018). Para tanto, os valores de delineamento de espécies propostos são de 95-96% para ANI e 70% para HDDd, como uma alternativa ao HDD convencional (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006; RICHTER; ROSSELLÓ-MORA, 2009).

A classificação bacteriana consiste de diversos níveis, sendo o maior nível o Domínio. Todos os organismos procarióticos são localizados dentro de dois domínios, *Archaea* e *Bacteria* e, para cada domínio, são descritos os filós, classes, ordens, famílias, gêneros, espécies e subespécies (BRENNER; STALEY; KRIEG; 2005).

Os rizóbios constituem um grupo de bactérias Gram-negativas que, de acordo com a taxonomia atual, encontram-se classificados como: Domínio: *Bacteria*; Filo: Proteobacteria; Classe: Alfaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*. Dentro da classe Alfaproteobacteria encontram-se “rizóbios” nos gêneros (entre parênteses, o número de espécies, capazes ou não de fixar nitrogênio, até 15/02/2021, LPSN, 2021): *Agrobacterium* (22), *Allorhizobium* (11), *Aminobacter* (16), *Azorhizobium* (3), *Blastobacter* (6), *Bradyrhizobium* (69), *Devosia* (33), *Ensifer*, anteriormente *Sinorhizobium* (25), *Mesorhizobium* (65), *Methylobacterium* (67), *Microvirga* (23), *Neorhizobium* (6), *Ochrobactrum* (32), *Pararhizobium* (8), *Phyllobacterium* (14), *Rhizobium* (142), *Shinella* (8); na Classe Betaproteobacteria; Ordem: Burkholderiales; encontra-se a família *Burkholderiaceae* e os gêneros de rizóbios: *Cupriavidus* (22) e *Paraburkholderia*, anteriormente *Burkholderia* (99) (PEIX *et al.*, 2015; VELÁZQUEZ *et al.*, 2017; LPSN, 2021).

No caso do feijoeiro, por se tratar de uma leguminosa promíscua, há relatos de nodulação com vários integrantes de vários gêneros como *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Pararhizobium*, além dos pertencentes à classe Betaproteobacteria, incluindo *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, mas os principais simbiontes são do gênero *Rhizobium* (HAN; WANG; CHEN, 2005; WANG *et al.*, 2016; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

Dentre as espécies já descritas e principais simbiontes do feijoeiro pertencentes ao gênero *Rhizobium* estão: *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. etli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993), *R. gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006), *R. phaseoli* (RAMÍREZ-BAHENA *et al.*, 2008), *R. endophyticum* (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010), *R. vallis* (WANG *et al.*, 2011), *R. leucaenae* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *R. mesoamericanum* (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2012), *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013), *R. azibense* (MNASRI *et al.*, 2014), *R. paranaense* (DALL'AGNOL *et al.*, 2014), *R. ecuadorensis* (RIBEIRO *et al.*, 2015), *R. acidisoli* (ROMÁN-PONCE *et al.*, 2016), *R. hidalgonense* (YAN *et al.*, 2017a), *R. aethiopicum* (ASERSE *et al.*, 2017), *R. esperanzae* (CORDEIRO *et al.*, 2017), e *R. chutanense* (HUO *et al.*, 2019).

Outras espécies da classe Alfaproteobacteria relatadas nodulando *Phaseolus vulgaris* são: *Sinorhizobium/Ensifer fredii* (SCHOLLA; ELKAN, 1984; YOUNG, 2003), *Ensifer meliloti* (ZURDO-PIÑEIRO *et al.*, 2009), *E. americanum* (MNASRI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013), *Mesorhizobium albiziae* (WANG *et al.*, 2007); *M. atlanticum* (HELENE *et al.*, 2019); *Agrobacterium fabacearum* (DELAMUTA *et al.*, 2020); *Pararhizobium giardini* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997; MOUSAVI *et al.*, 2015); *Phyllobacterium endophyticum* (FLORES-FELIX *et al.*, 2013).

Na classe Betaproteobacteria, as espécies *Paraburkholderia phymatum* (TALBI *et al.*, 2010), *P. caballeronis* (MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013; SAWANA *et al.*, 2014), *P. nodosa* (DALL'AGNOL *et al.*, 2016); e *Cupriavidus necator* (DA SILVA *et al.*, 2012), são capazes de formar nódulos efetivos em feijoeiro e foram isoladas de diferentes regiões do Brasil e do mundo (ASERSE *et al.*, 2017; HUO *et al.*, 2019; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

A taxonomia polifásica de procariontes está ganhando cada vez mais atenção, o que se deve tanto à valorização da biodiversidade, como ao reconhecimento da importância econômica e ambiental de muitos

microrganismos. De acordo com Straliozzo (2005), os estudos taxonômicos e filogenéticos são necessários para conhecer a biodiversidade dos rizóbios presentes no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução das simbioses, com importantes aplicações práticas. Apesar da importância que os rizóbios representam, os estudos sobre a filogenia e taxonomia de rizóbios são relativamente escassos, inclusive em países onde a diversidade genética é elevada, como o Brasil.

### 3.5. Métodos de análise para determinação da diversidade genética

#### 3.5.1. BOX-PCR *Fingerprinting*

Diversas técnicas moleculares vêm sendo aplicadas para determinar a diversidade bacteriana, sendo o BOX-PCR muito utilizado em estudos iniciais de caracterização genética de isolados devido seu poder de discriminação, confiabilidade em diferenciar estirpes distintas e repetibilidade do método (HUNGRIA *et al.*, 2008). A técnica consiste na amplificação de sequências repetitivas (*rep-elements*) do genoma, onde o produto de PCR origina uma “impressão digital” do genoma bacteriano e, por isso, os perfis são denominados como *DNA fingerprinting* (VERSALOVIC *et al.*, 1994).

Os elementos repetitivos BOX são os mais utilizados para obtenção de *DNA fingerprinting* de microrganismos ambientais (DALL’AGNOL *et al.*, 2016) e são compostos por várias combinações de três subunidades, *boxA*, *boxB* e *boxC* (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995). Em geral, utiliza-se a subunidade *boxA* (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), por ser a mais conservada, além do seu tamanho (57 pb) e frequência no genoma serem ideais para uma análise representativa (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Diferente da amplificação por PCR tradicional, na análise por BOX-PCR é utilizado apenas um iniciador, pois as sequências desse elemento encontram-se com orientação invertida no genoma (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994). Os fragmentos resultantes da reação de BOX-PCR são submetidos à eletroforese e cada indivíduo gera um padrão específico de *amplicons*, demonstrando diversidade intraespecífica (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

### 3.5.2. Filogenia do gene 16S RNAr e genes *housekeeping*

O sequenciamento e a análise do gene 16S RNAr tem se mostrado adequado para a classificação de procariontes, sendo considerado um excelente marcador filogenético por estar onipresente nos procariotos, o que permite a utilização de iniciadores universais, ter tamanho (aproximadamente 1500 pares de bases) ideal para a aplicação em diversas técnicas moleculares e ter sequência considerada conservada, mas com sítios variáveis suficientes para revelar relações filogenéticas a nível de gênero (WEISBURG *et al.*, 1991; LUDWIG; SCHLEIFER, 1994; RAMASAMY *et al.*, 2014).

O sequenciamento do gene 16S RNAr envolve a amplificação por PCR de um fragmento do gene usando *primers* direcionados a regiões conservadas na molécula. A definição de espécie proposta por Vandamme e colaboradores (1996) é que sequências que apresentam similaridade inferior a 97% em relação à estirpe tipo podem indicar uma provável nova espécie, porém, autores como Chun e colaboradores (2018) sugerem que o valor de similaridade de 98,7% pode ser utilizado em espécies que apresentem baixa variabilidade do gene 16S RNAr (STACKEBRANDT; EBERS 2006; KIM *et al.*, 2014).

Embora a sequência do gene 16S RNAr seja de grande importância para relatar a diversidade de grupos a nível de gênero, em muitos casos, ela é conservada demais para distinguir espécies intimamente relacionadas (THOMPSON *et al.*, 2013).

Conseqüentemente, uma nova metodologia para estudos de taxonomia e filogenia bacteriana vem sendo aplicada, utilizando genes com taxas evolutivas mais rápidas do que o gene ribossomal 16S, mas também conservadas o bastante para reter informações filogenéticas. Essa técnica é chamada de *MultiLocus Sequence Analysis* (MLSA), e consiste no sequenciamento e análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), codificadores de proteínas conservadas, conhecidos como genes *housekeeping* (GEVERS *et al.*, 2005; ASERSE *et al.*, 2012).

A escolha dos genes *housekeeping* empregados nos estudos deve seguir alguns pré requisitos, como estarem presentes em uma única cópia no genoma e terem tamanho suficiente para possibilitar a análise. Os mais utilizados em estudos com rizóbios são *atpD*, *dnaJ*, *dnaK*, *gap*, *glnA*, *gltA*, *glnII*, *gyrB*, *pnp*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *thrC* (GEVERS *et al.*, 2005; KASCHUK; HUNGRIA, 2017) e são necessários, no mínimo, cinco genes para a concatenação das sequências obtidas, onde os valores

de referência devem ser de 94% de identidade nucleotídica para os genes *housekeeping* individuais e de 96% na análise concatenada (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006; ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015). No entanto, estudos como os de Rouhrazi; Khodakaramian; Velázquez (2016); Wang *et al.* (2016); Zinga; Jaiswal; Dakora (2017), Costa *et al.* (2018), Paulitsch *et al.* (2019) e Chibeba *et al.* (2020) demonstram que a utilização de até três genes *housekeeping* pode permitir a identificação, de forma eficiente, da posição taxonômica de rizóbios.

Além disso, análises que utilizam do sequenciamento completo do genoma, como hibridação DNA-DNA digital, comparação da identidade média dos nucleotídeos com estirpes-tipo e quantificação do conteúdo G+C são técnicas amplamente utilizadas na taxonomia polifásica (TINDAL *et al.*, 2010; RAMASAMY *et al.*, 2014; CHUN *et al.*, 2018).

Atualmente a avaliação da diversidade microbiana é obtida, principalmente, por técnicas moleculares. Entretanto, avaliar as características fenotípicas é o primeiro passo para a determinação de novos grupos taxonômicos de microrganismos, sendo a caracterização de um isolado o elemento chave da taxonomia (TINDALL *et al.*, 2010; MOORE *et al.*, 2010).

Como já mencionado, as características fenotípicas envolvem análises morfológicas, fisiológicas, sorológicas e quimiotaxonômicas dos microrganismos, como tempo de crescimento, tamanho, forma, borda e coloração das colônias, coloração de gram, alteração de pH do meio, produção de muco, tolerância ou sensibilidade a antibióticos, crescimento em diferentes temperaturas, salinidade, uso de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, perfil de ácidos graxos, entre outros (VANDAMME *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 2010). Individualmente, muitas dessas características demonstraram ser insuficientes mas, no todo, elas fornecem informações descritivas que permitem reconhecer táxons, além de serem essenciais na caracterização de microrganismos, tendo por objetivo, também, avaliar a adaptabilidade dos isolados às diferentes condições ambientais em que podem ser expostos em um ecossistema (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

Estudos como os de Grange e Hungria (2004); Stocco *et al.* (2008), Ribeiro *et al.* (2009); Torres *et al.* (2009); Dall'Agnol *et al.* (2017) e Costa *et al.* (2018) indicaram alta diversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro em diferentes ecossistemas brasileiros. Destaca-se, com isso, a importância de dar seguimento aos estudos de diversidade desses microssimbiontes. Esses estudos podem esclarecer relações

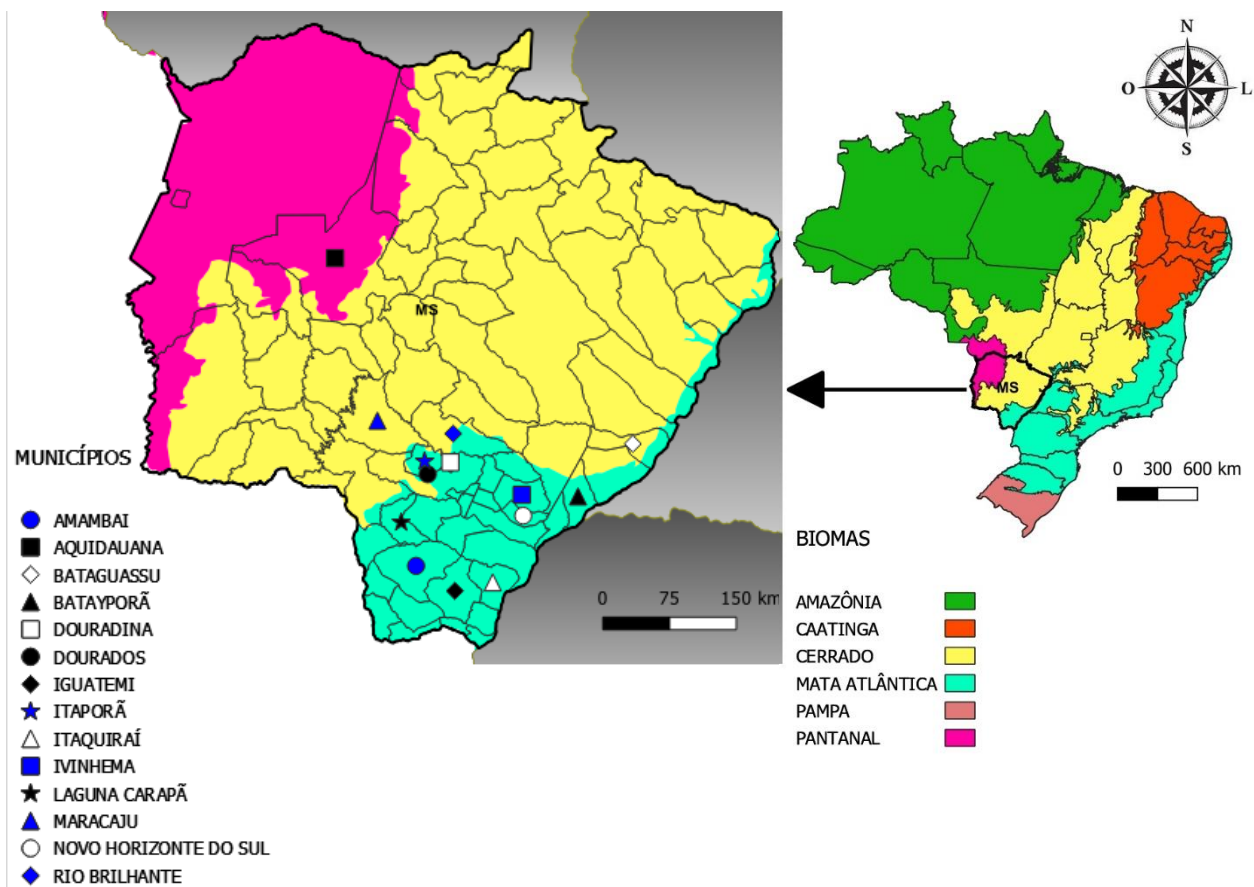
filogenéticas de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro, bem como auxiliar na identificação de estirpes mais eficientes e com potencial biotecnológico para a cultura.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Estirpes utilizadas**

Foram utilizadas 82 estirpes bacterianas provenientes de 14 municípios do Mato Grosso do Sul (Figura 2 e Tabela 1). Solos dessas regiões foram coletados e utilizados para cultivar o feijoeiro como planta isca para capturar os rizóbios. As estirpes foram isoladas pelo pesquisador Dr. Fábio Martins Mercante (Embrapa Agropecuária Oeste) e encontram-se atualmente depositadas na “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja, WFCC Collection # 1213, WDCM Collection # 1054), criopreservadas em glicerol 30% a -80 °C e -150 °C e liofilizadas.

**Figura 2** - Localização dos municípios e biomas nos quais as amostras de solos foram coletadas no Estado do Mato Grosso do Sul.



Fonte: A própria autora (Adaptado de IBGE, 2020)

**Tabela 1** - Municípios e biomas de isolamento das estirpes no estado de Mato Grosso do Sul e identificação das estirpes (CNPSo) utilizadas neste estudo.

	MUNICÍPIOS	BIOMAS	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS (CNPSo)
1.	Amambaí	Mata Atlântica	3435/ 3631
2.	Aquidauana	Cerrado e Pantanal	4038/ 4039
3.	Bataguassu	Cerrado e Mata Atlântica	3436/ 3437/ 3457/ 3460/ 3462/ 3464
4.	Batayporã	Cerrado e Mata Atlântica	3439
5.	Douradina	Mata Atlântica	3529/ 3636
6.	Dourados	Cerrado e Mata Atlântica	3966/ 3968/ 3969/ 3971/ 3972/ 3973 / 4053/ 4054/ 4055/ 4056/ 4057/ 4058/ 4061/ 4062/ 4063/ 4064
7.	Iguatemi	Mata Atlântica	3497
8.	Itaporã	Cerrado e Mata Atlântica	3974/ 3975/ 3976/ 3977/ 3978/ 3979/ 3981/ 3982/ 3988
9.	Itaquiraí	Mata Atlântica	3440/ 3465/ 3490/ 3493/ 3494
10.	Ivinhema	Mata Atlântica	3467/ 3468/ 3469/ 3470/ 3495/ 3496
11.	Laguna Carapã	Mata Atlântica	3984/ 3985/ 3986/ 3987/ 3990/ 3991
12.	Maracajú	Cerrado e Mata Atlântica	3993/ 3994/ 3995/ 3997/ 3998/ 3999/ 4000/ 4001/ 4007
13.	Novo Horizonte do Sul	Mata Atlântica	3498/ 3499/ 3500/ 3501/ 3502/ 3633/ 3634
14.	Rio Brillhante	Cerrado e Mata Atlântica	4002/ 4003/ 4005/ 4006/ 4031/ 4032/ 4033/ 4034/ 4035/ 4036

**Fonte:** A própria autora (Adaptado de IBGE, 2021; INFOSANBAS, 2021)

## 4.2. Caracterização Genética

### 4.2.1. Extração de DNA Total

As 82 estirpes foram inoculadas em frascos, contendo aproximadamente 10 mL de meio YM líquido e incubadas a 28 °C sob agitação de 100 rpm, por três dias. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o *kit Dneasy Blood & Tissue* (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo visualizado sob luz ultravioleta (UV). Após a extração, os DNAs foram armazenados em microtubos de 1,5mL a -20°C e utilizados para análises posteriores.

### 4.2.2. Reação de BOX-PCR *Fingerprinting*

Para análise da variabilidade genotípica das 82 estirpes, foi realizada reação de PCR com um único *primer*, o BOX-A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994) seguindo as modificações propostas por Kaschuk *et al.* (2006). A reação de amplificação contou com um volume final de 25 µL, contendo: 13,8 µL de água ultra pura estéril; 5,0 µL de dNTPs, (1,5 mmol/L de cada nucleotídeo); 2,5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L); 1,0 µL do *primer* BOX-A1R (50 pmol/ µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL).

As reações foram realizadas no termociclador (*ProFlex PCR System Applied Biosystems*) seguindo um ciclo inicial de 95°C por 7 minutos; seguido de 35 ciclos de (94°C a 1 minuto, 53°C a 1 minuto e 65°C a 8 minutos), e um ciclo final de 65°C por 16 minutos (KASCHUK *et al.* 2006).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se o *1 kb Plus Ladder* (Invitrogen®) como marcador de peso molecular.

Os perfis genéticos foram utilizados para construção de um dendrograma de similaridade, utilizando o programa *Bionumerics* (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973) para a análise do agrupamento e o coeficiente de

Jaccard (JACCARD, 1912), com 2% de tolerância.

#### 4.2.3. Amplificação do gene ribossomal 16S

O DNA de 54 estirpes representativas dos grupos identificados na análise de BOX-PCR foram utilizados para amplificação por PCR do gene 16S RNAr. A reação contou com os *primers* universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991). Para cada reação foi preparada uma mistura contendo 5,0 µL tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 3,0 µL de dNTPs (1,5 mmol/L de cada nucleotídeo), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L), 1,5 µL do *primer* fD1 (10 pmol/µL), 1,5 µL do *primer* rD1 (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 2,0 µL DNA (de 10 a 20 ng/µL) e água ultrapura esterilizada até completar um volume final de 50 µL. As condições da amplificação incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; com um ciclo final de extensão por 5 minutos a 72°C (WEISBURG *et al.*, 1991; MENNA *et al.*, 2006).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos, com auxílio de um marcador de peso molecular. A purificação foi realizada com o *kit PureLink* (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante, e novamente, os produtos purificados foram submetidos à eletroforese, para confirmação do processo. As amostras com indentificação de baixa concentração foram concentradas em um concentrador à vácuo (*Concentrador Plus*, Eppendorf).

#### 4.2.4. Amplificação do gene *housekeeping glnII*

O gene *glnII* (glutamina sintetase II) de 34 estirpes classificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* na análise do gene 16S RNAr foram amplificados utilizando os *primers* TsglnII<sub>f</sub> (5'-AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG-3') e TsglnII<sub>r</sub> (5'-SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCTG-3') (STEPKOWSKI *et al.*, 2005). Cada reação foi conduzida em um volume final de 50 µL, contendo 35,3 µL de água ultrapura estéril; 3,0 µL de dNTPs, (1,5 mmol/L de cada nucleotídeo); 5,0 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L); 1,0 µL de cada

iniciador (10 pmol/ $\mu$ L); 2,0  $\mu$ L de DNA (50 ng/ $\mu$ L) e 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L).

A amplificação das sequências no termociclador ocorreu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de (45 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 56°C (anelamento) e 1,5 minutos a 72°C (extensão)); com um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (STEPKOWSKI *et al.*, 2005).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do tamanho dos fragmentos com auxílio de um marcador de peso molecular. A purificação foi realizada com o auxílio do *kit PureLink* (Invitrogen®), seguindo-se as instruções do fabricante e submetidas à eletroforese, para confirmação do processo.

#### 4.2.5. Sequenciamento e análise dos genes 16S RNAr e *glnII*

Para o sequenciamento, os produtos de PCR dos genes 16S RNAr e *glnII*, purificados foram submetidos a uma nova amplificação. A reação foi preparada com 3,0  $\mu$ L de DNA (50 ng/  $\mu$ L) 1,3  $\mu$ L de *BigDye* (compatível com o sequenciador ABI3500XL, *Applied Biosystems*), 1,0  $\mu$ L de cada *primer* (3,2 pmol/ $\mu$ L), 2,5  $\mu$ L de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris–HCl, pH 8,4) e 12,2  $\mu$ L de água ultra pura estéril, totalizando um volume de 20  $\mu$ L por reação, distribuídos em placas de 96 poços (DELAMUTA *et al.*, 2017). Para o sequenciamento do gene 16S RNAr, foram utilizados os *primers* 362f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3') e 786r (5'CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3'), para o gene *housekeeping glnII* os primers foram os mesmos utilizados na amplificação, mas com uma concentração mais baixa (3,2 pmol  $\mu$ L).

A reação de PCR realizada no termociclador seguiu de um ciclo inicial de 96°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de (96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos). As condições de PCR foram as mesmas para os dois genes.

Após a amplificação, as amostras foram novamente purificadas de acordo com procedimento descrito por Menna e colaboradores (2006), com modificações propostas por Delamuta *et al.* (2017). Nessa etapa, cada poço da placa recebeu 2  $\mu$ L de acetato de amônio estéril (7,5 M) e 65  $\mu$ L de etanol a 99,5% (temperatura ambiente). A placa foi selada, homogeneizada e submetida a uma centrifugação de 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram

adicionados 150 µL de etanol 70%, a placa foi novamente selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 20 min. Após o descarte do sobrenadante, uma nova centrifugação foi realizada a uma rotação de 300 rpm por cerca de 25 segundos para remover os resíduos. A placa foi incubada em uma estufa a 37°C por cerca de 30 min para secagem do material.

Depois da secagem completa, foi realizada a desnaturação das amostras, pela ressuspensão em 10 µL de formamida, seguida pelo aquecimento em termociclador à 95°C durante 5 minutos e resfriamento por 2 minutos em gelo. Ao final, as amostras foram submetidas ao sequenciador ABI 3500XL, *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* para leitura das amostras.

As sequências geradas foram analisadas com o programa *Bionumerics* versão 7.6 e comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), visando identificar espécies intimamente relacionadas com as sequências em estudo, utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A partir desse levantamento inicial foram definidas as estirpes tipo mais próximas de cada grupo, visando a sua inclusão nas análises filogenéticas.

O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, versão 7.0) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) foi utilizado para alinhamento das sequências e construção das árvores filogenéticas, com algoritmo de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML) (FELSENSTEIN, 1981) e suporte estatístico avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992). A identidade nucleotídica das sequências foi analisada mediante alinhamento no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (v.7.2.5) (HALL, 1999). E os modelos utilizados para a construção das árvores estão descritos na legenda das figuras.

Todas as sequências obtidas neste estudo foram enviadas para depósito no banco de dados GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os números de acesso que constam da Tabela 2.

#### 4.3. Caracterização Morfofisiológica

As 37 estirpes classificadas como alfaproteobacteria, nos gêneros de “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* foram avaliadas quanto ao tempo de crescimento, consistência da massa de crescimento, produção de muco, tamanho, forma, elevação,

borda e superfície das colônias em meio de cultura *Yeast Mannitol Agar* (YMA) modificado (manitol 5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L; NaCl ,0,1 g/L; extrato de levedura 0,4 g/L; ágar 6 g/L), e pH ajustado na faixa de 6,8 a 7,0. Outras características, como detalhes ópticos, alteração de pH no meio YMA com indicador azul de bromotimol (ABT) e cromogênese da colônia em meio YMA com indicador vermelho Congo (VC) e indicador azul de bromotimol também foram avaliadas conforme método descrito por Vincent (1970) e Somasegaran; Hoben (1994). Todos os testes foram realizados mediante incubação a 28°C, em triplicata.

#### 4.3.1. Manifestação de Crescimento

As estirpes foram repicadas em meio YMA contendo Vermelho Congo (VC) e avaliadas quanto à manifestação de crescimento (colônias isoladas). O corante Vermelho Congo foi adicionado para permitir a diferenciação entre contaminantes, os quais absorvem o corante, resultando em colônias vermelhas ou rosas escuras. Foram analisadas, no mínimo, três colônias isoladas para registrar a manifestação, seguindo-se então à classificação como: rápido (até 3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 9 dias) ou muito lento (acima a 10 dias).

#### 4.3.2. Diâmetro das Colônias

O diâmetro das colônias foi medido com o auxílio de um paquímetro e um estereomicroscópio. O valor do diâmetro corresponde à média em milímetros de pelo menos três colônias isoladas, avaliadas de acordo com a manifestação de crescimento.

#### 4.3.3. Produção de Muco

Após a manifestação de crescimento, foi realizada a verificação da produção de muco, sendo caracterizadas como: pouca produção (colônias que apresentam tamanho ≤ 1,9 mm), produção moderada (colônias que apresentam tamanho entre 2 a 3,9 mm) e produção abundante (quando o tamanho das colônias for ≥ 4 mm).

#### 4.3.4. Alteração do pH do meio

As estirpes foram crescidas em meio YMA contendo o indicador azul de bromotimol. As colônias foram analisadas quanto à: reação ácida se houver alteração da coloração do meio para amarelo; reação alcalina, se houver alteração da coloração do meio para azul e neutra se a coloração original do meio (verde) for mantida.

#### 4.3.5. Forma, Borda, Superfície e Elevação das Colônias

As colônias isoladas foram observadas com auxílio de um estereomicroscópio quanto a sua forma: circular, oval (elíptica) ou irregular. Borda: lisa, ondulada ou filamentosa. Superfície: lisa ou rugosa. E elevação: plana (crescimento rente à placa), ou convexa (crescimento acima do meio de cultura); esta última análise foi realizada visualizando as placas lateralmente.

#### 4.3.6. Consistência da Massa de Crescimento

A massa de crescimento das colônias foi avaliada quanto a sua consistência com auxílio de uma alça de platina previamente flambada e resfriada, a qual foi arrastada sobre a colônia isolada, sendo classificada como: aquosa (totalmente desmanchada quando tocada); seca (pouca massa de crescimento); gomosa (podem ser arrastadas sobre o meio de cultura sem se desmanchar, deixando um pequeno rastro) e viscosa (aspecto elástico).

#### 4.3.7. Detalhes Ópticos

As colônias foram analisadas quanto aos detalhes ópticos com o auxílio de uma caneta preta (retroprojeter), realizando-se um risco no fundo da placa atrás das colônias que foram classificadas como: translúcidas (se o risco aparece através da massa de consistência) ou opacas (se o risco for pouco visível ou totalmente coberto pela massa de consistência).

#### 4.3.8. Cromogênese em YMA contendo azul de bromotimol e vermelho Congo

As estirpes foram repicadas em meio de cultura YMA contendo azul de

bromotimol e avaliadas quanto à coloração das colônias, sendo classificadas como: creme; amarela; rosa ou azul. Também foram avaliadas em meio YMA contendo VC, sendo classificadas como: branca; rosada; avermelhada (centro) ou vermelha.

#### 4.4. Capacidade de nodulação e eficiência da fixação de nitrogênio

As estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de nodulação e eficiência dos nódulos na planta hospedeira *Phaseolus vulgaris*, cultivar Esteio. Foram avaliadas 37 estirpes identificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium*, de acordo com a análise filogenética do gene 16S RNAr. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em sacos de propileno, com cinco repetições por estirpe.

Inicialmente, os inóculos de cada estirpe foram crescidos em frascos, contendo aproximadamente 10 mL de meio YM líquido e incubados a 28°C sob agitação durante três dias. Além das 37 estirpes utilizadas no estudo, o experimento contou com um controle negativo, não inoculado e um controle positivo, inoculado com a estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899<sup>T</sup>, altamente eficiente com o feijoeiro.

As sementes de feijoeiro passaram por um procedimento de desinfestação da superfície, que consiste em uma lavagem com etanol 70% por 1 min, seguida de lavagem com água destilada esterilizada, uma lavagem com uma solução de hipoclorito de sódio (0,4 – 0,6%) por cinco minutos, seguida por seis lavagens com água destilada esterilizada (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).

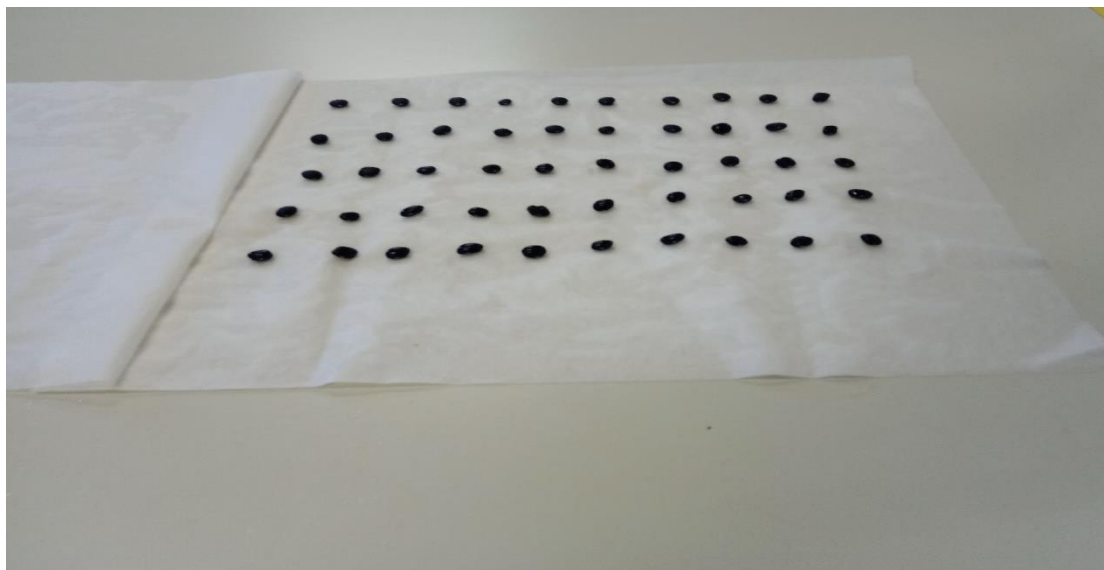
Após a desinfestação, as sementes foram pré-germinadas em papel germiteste umedecido com água destilada. Cada rolo de papel germiteste acomodou 50 sementes, sendo necessários três papéis germiteste por rolo, que foram pesados em balança analítica e o peso dos papéis foi multiplicado por 2,5, resultando no volume de água destilada estéril necessário para umedecer o papel. Os papéis foram umedecidos em uma bandeja e 50 sementes foram acomodadas (Figura 3). A seguir, o papel foi dobrado nas laterais, enrolado e amarrado com elástico, sendo então incubados durante 3 dias em germinador a 25°C.

Após a germinação, cada saco de polipropileno (Figura 4), contendo 1 folha de papel germiteste e 300 mL de solução nutritiva livre de N, e com pH ajustado na faixa de 6,6 a 6,8, recebeu uma plântula e 1 mL de inóculo. Os sacos foram levados para casa de vegetação um dia após a inoculação.

A verificação da capacidade da nodulação e eficiência dos nódulos foram

verificadas 30 dias após a inoculação, sendo confirmada pela presença de nódulos, onde foram retirados três nódulos por repetição, que em seguida foram cortados ao meio com auxílio de uma lâmina, sendo verificada pela coloração interna dos nódulos, devido à leghemoglobina (branco indicando fixação ineficiente e vermelho ou rosa indicando fixação eficiente).

**Figura 3** - Papel germiteste umedecido acomodando 50 sementes de feijão da variedade Esteio.



**Fonte:** A própria autora

**Figura 4** - Inoculação de 1 mL das estirpes em radículas de feijoeiro, realizado em cinco repetições.



**Fonte:** A própria autora

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização Genética

#### 5.1.1. BOX-Fingerprinting

Com base nos perfis de DNA obtidos através da reação de BOX-PCR, um dendrograma foi construído com as 82 estirpes em estudo isoladas de 14 municípios do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Figura 5).

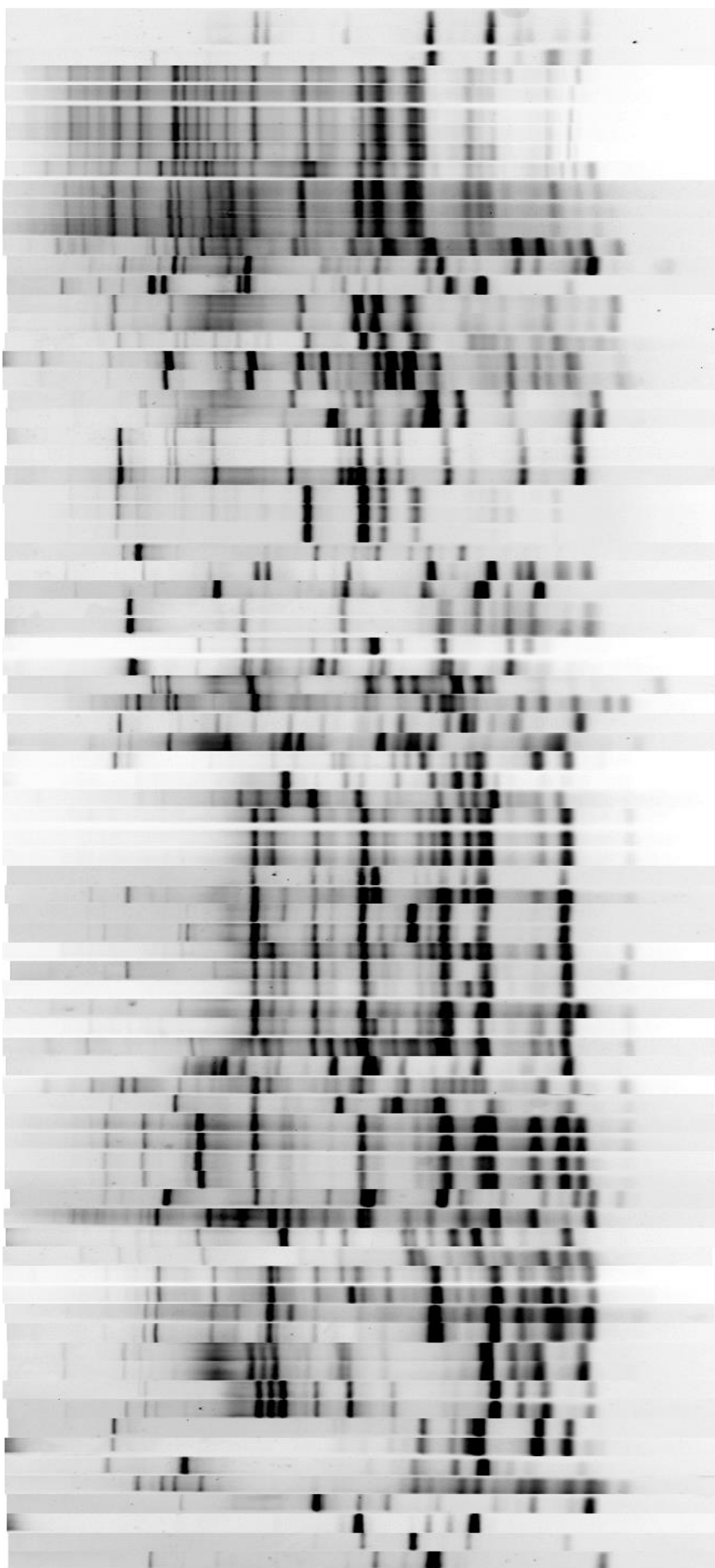
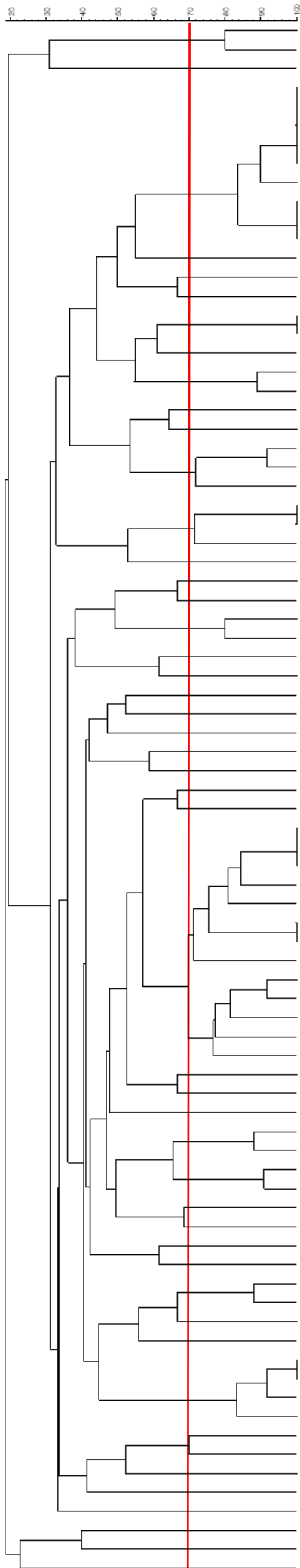
Considerando um ponto de corte de 70% de similaridade e as bandas selecionadas na faixa de 300 a 3000 pares de base (pb), os 48 perfis genéticos gerados pelo dendrograma indicaram uma alta variabilidade genotípica entre as 82 estirpes, com 36 ocupando posições isoladas e havendo a formação de 12 grupos. Os números apresentados em parênteses no dendrograma são referentes aos municípios de isolamento (Tabela 1), e foi possível observar heterogenidade elevada em relação aos agrupamentos dos isolados e seus municípios de origem.

Os maiores agrupamentos formados foram o grupo 27, com 13 isolados, seguido do grupo 3, com nove isolados e o grupo 40, com quatro isolados. Os demais grupos apresentaram três (12 e 13) ou dois isolados (1, 7, 9, 17, 31, 32 e 37) cada.

Vale a pena ressaltar que dos perfis gerados nesta análise a similaridade de 100% apareceu apenas em cinco grupos, observada entre os isolados CNPSo 3496 e 3500 com 3502, 3633 e 3634 (grupo 3); CNPSo 3494 e 3499 com 3501 (grupo 3); CNPSo 3437 com 3457 (grupo 7); CNPSo 3493 com 3495 (grupo 13); CNPSo 4053 e 4054 com 4055 (grupo 27); CNPSo 3971 com 3972 (grupo 27) e CNPSo 3460 com 3462 (grupo 40). A similaridade de 100% poderia indicar a existência de clones.

Dos 48 perfis gerados foram selecionadas 54 estirpes, sendo uma representante de cada, e outras seis que apresentaram maior variabilidade dentro dos perfis. Estas 54 estirpes foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S RNAr.

**Figura 5** - Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard com 2% de tolerância, utilizando o *software* Bionumerics 7.6. Os números em parenteses representam os municípios de isolamento no estado de Mato Grosso do Sul.



- CNPSo 3994 (12) ] 1
- CNPSo 3996 (12) ] 2
- CNPSo 3997 (12) ] 2
- CNPSo 3496 (10) ] 3
- CNPSo 3500 (13) ] 3
- CNPSo 3502 (13) ] 3
- CNPSo 3633 (13) ] 3
- CNPSo 3634 (13) ] 3
- CNPSo 3498 (13) ] 3
- CNPSo 3494 (9) ] 3
- CNPSo 3499 (13) ] 3
- CNPSo 3501 (13) ] 3
- CNPSo 3490 (9) ] 4
- CNPSo 3968 (6) ] 5
- CNPSo 3981 (8) ] 6
- CNPSo 3437 (3) ] 7
- CNPSo 3457 (3) ] 7
- CNPSo 3440 (9) ] 8
- CNPSo 3469 (10) ] 9
- CNPSo 3470 (10) ] 9
- CNPSo 3436 (3) ] 10
- CNPSo 3529 (5) ] 11
- CNPSo 3998 (12) ] 12
- CNPSo 4000 (12) ] 12
- CNPSo 3966 (6) ] 12
- CNPSo 3493 (9) ] 13
- CNPSo 3495 (10) ] 13
- CNPSo 3497 (7) ] 13
- CNPSo 4039 (2) ] 14
- CNPSo 3993 (12) ] 15
- CNPSo 3976 (8) ] 16
- CNPSo 3467 (10) ] 17
- CNPSo 3468 (10) ] 17
- CNPSo 3990 (11) ] 18
- CNPSo 4064 (6) ] 19
- CNPSo 3435 (1) ] 20
- CNPSo 4062 (6) ] 21
- CNPSo 4001 (12) ] 22
- CNPSo 3464 (3) ] 23
- CNPSo 3985 (11) ] 24
- CNPSo 3986 (11) ] 25
- CNPSo 4061 (6) ] 26
- CNPSo 4053 (6) ] 27
- CNPSo 4054 (6) ] 27
- CNPSo 4055 (6) ] 27
- CNPSo 3969 (6) ] 27
- CNPSo 4036 (14) ] 27
- CNPSo 3971 (6) ] 27
- CNPSo 3972 (6) ] 27
- CNPSo 4058 (6) ] 27
- CNPSo 3974 (8) ] 27
- CNPSo 4056 (6) ] 27
- CNPSo 4032 (14) ] 27
- CNPSo 3991 (11) ] 27
- CNPSo 3439 (4) ] 27
- CNPSo 3631 (1) ] 28
- CNPSo 4063 (6) ] 29
- CNPSo 4003 (14) ] 30
- CNPSo 4006 (14) ] 31
- CNPSo 4031 (14) ] 31
- CNPSo 4002 (14) ] 32
- CNPSo 4034 (14) ] 32
- CNPSo 3975 (8) ] 33
- CNPSo 3987 (11) ] 34
- CNPSo 3636 (5) ] 35
- CNPSo 3988 (8) ] 36
- CNPSo 3984 (11) ] 37
- CNPSo 4057 (6) ] 37
- CNPSo 4005 (14) ] 38
- CNPSo 4007 (12) ] 39
- CNPSo 3460 (3) ] 40
- CNPSo 3462 (3) ] 40
- CNPSo 4038 (2) ] 40
- CNPSo 3979 (8) ] 40
- CNPSo 3978 (8) ] 41
- CNPSo 3465 (9) ] 42
- CNPSo 4036 (14) ] 43
- CNPSo 4033 (14) ] 44
- CNPSo 3982 (8) ] 45
- CNPSo 3999 (12) ] 46
- CNPSo 3977 (8) ] 47
- CNPSo 3973 (6) ] 48

## 5.2. Caracterização Filogenética

### 5.2.1. Análises do gene 16S RNAr

As sequências obtidas do gene 16S RNAr foram submetidas à ferramenta Blast, para identificação dos possíveis gêneros aos quais pertencem.

Nesta análise, 22 das 54 estirpes foram identificadas como representantes de três gêneros da classe alfa proteobacteria conhecidos como “rizóbios clássicos”, sendo *Rhizobium* (20 estirpes), *Bradyrhizobium* (1) e *Mesorhizobium* (1). As demais (32 estirpes) foram identificadas como membros dos gêneros *Agrobacterium* (15), *Herbaspirillum* (11), *Pseudomonas* (2), *Achromobacter* (1), *Brevibacillus* (1), *Burkholderia* (1) e *Enterobacter* (1) representantes das classes Alfa proteobacteria e Beta proteobacteria. A distribuição das 54 estirpes em 10 gêneros apontou alta diversidade entre o grupo em estudo.

**Tabela 2** - Números de acesso das sequências do gene 16S RNAr utilizadas neste estudo.

Estirpes (CNPSO)	16S RNAr	Estirpes (CNPSO)	16S RNAr
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSO 3435	MW598315	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3978	MW598340
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3436	-	<i>Brevibacillus</i> sp. CNPSO 3981	MW598341
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3437	MW598316	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3982	MW598342
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3440	MW598317	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3985	MW598343
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3462	MW598318	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3986	MW598344
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3464	MW598319	<i>Enterobacter</i> sp. CNPSO 3987	MW598345
<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3465	MW598320	<i>Achromobacter</i> sp. CNPSO 3988	MW598346
<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3468	MW598321	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3990	MW598347
<i>Burkholderia</i> sp. CNPSO 3469	MW598322	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3993	MW598348
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3490	MW598323	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3995	MW598349
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3493	MW598324	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3997	MW598350
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3497	MW598325	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3999	MW598351
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3498	-	<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 4001	MW598352
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3499	MW598326	<i>Pseudomonas</i> sp. CNPSO 4003	MW598353
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3529	MW598327	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4005	MW598354
<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3631	MW598328	<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 4006	MW598355
<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3636	MW598329	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4007	MW598356
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3966	MW598330	<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 4032	MW598357
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 3968	MW598331	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4033	MW598358
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3969	MW598332	<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 4035	MW598359
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3971	MW598333	<i>Pseudomonas</i> sp. CNPSO 4036	MW598360
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3972	MW598334	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4039	MW598361
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3973	MW598335	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4057	MW598362
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3974	MW598336	<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 4058	MW598363
<i>Mesorhizobium</i> sp. CNPSO 3975	MW598337	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4062	MW598364
<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 3976	MW598338	<i>Rhizobium</i> sp. CNPSO 4063	MW598365
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSO 3977	MW598339	<i>Herbaspirillum</i> sp. CNPSO 4064	MW598366

Fonte: A própria autora

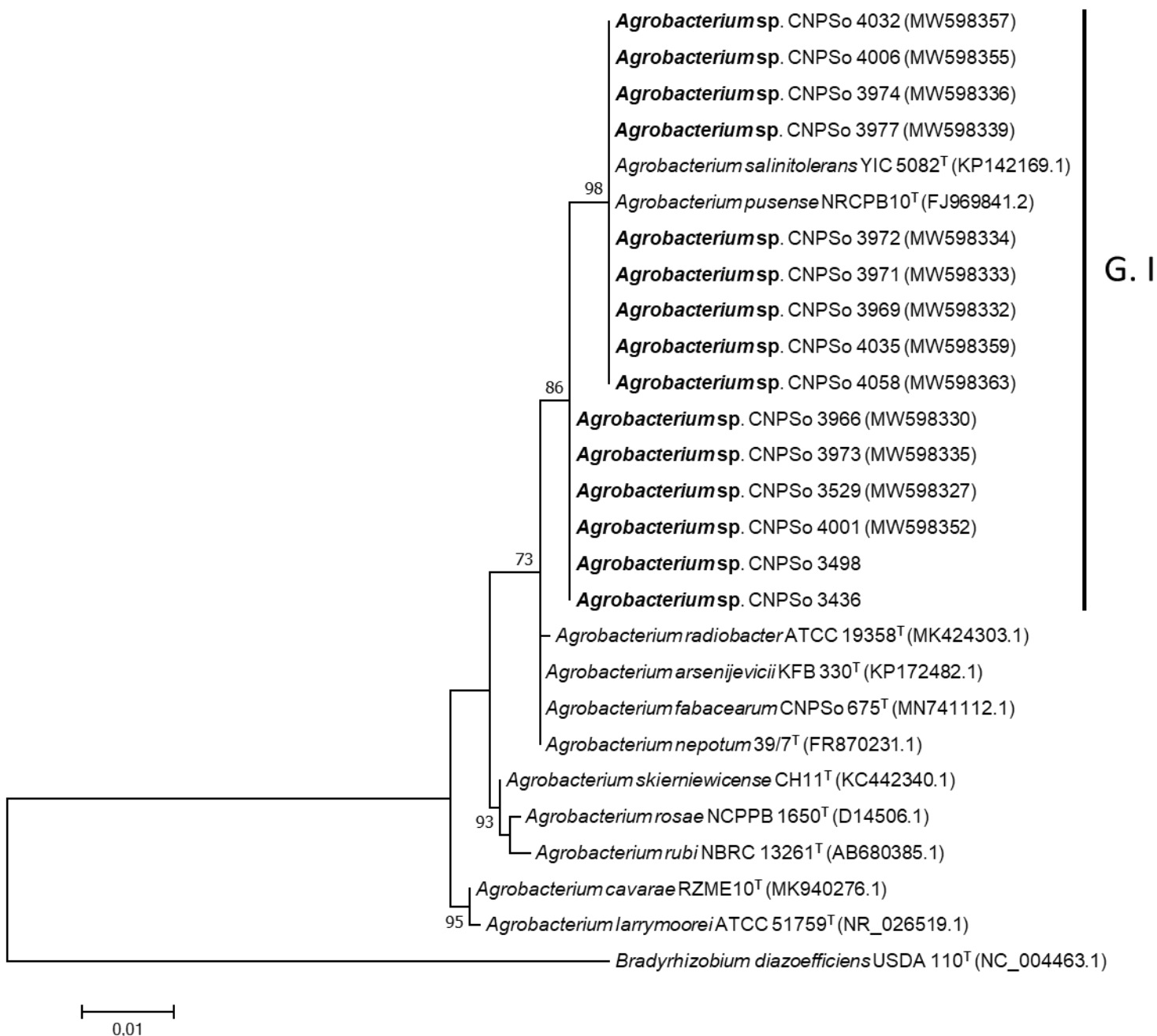
Para confirmar a posição filogenética em nível de gênero de 37 estirpes identificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium*, as sequências foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas. Quatro árvores filogenéticas foram construídas com os gêneros *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, os alinhamentos contaram com, aproximadamente, 942 pb, 953 pb, 968 pb e 944 pb, respectivamente.

Na árvore com o gênero *Agrobacterium* (Figura 6), um grande grupo foi formado, agrupando 15 estirpes de *Agrobacterium* spp. em estudo com as espécies *A. salinitolerans* YIC 5082<sup>T</sup> e *A. pusense* NRCPB10<sup>T</sup>, com 86% de suporte estatístico e compartilhando Identidade Nucleotídica (IN) de 99,4 a 100% entre elas (Tabela 3).

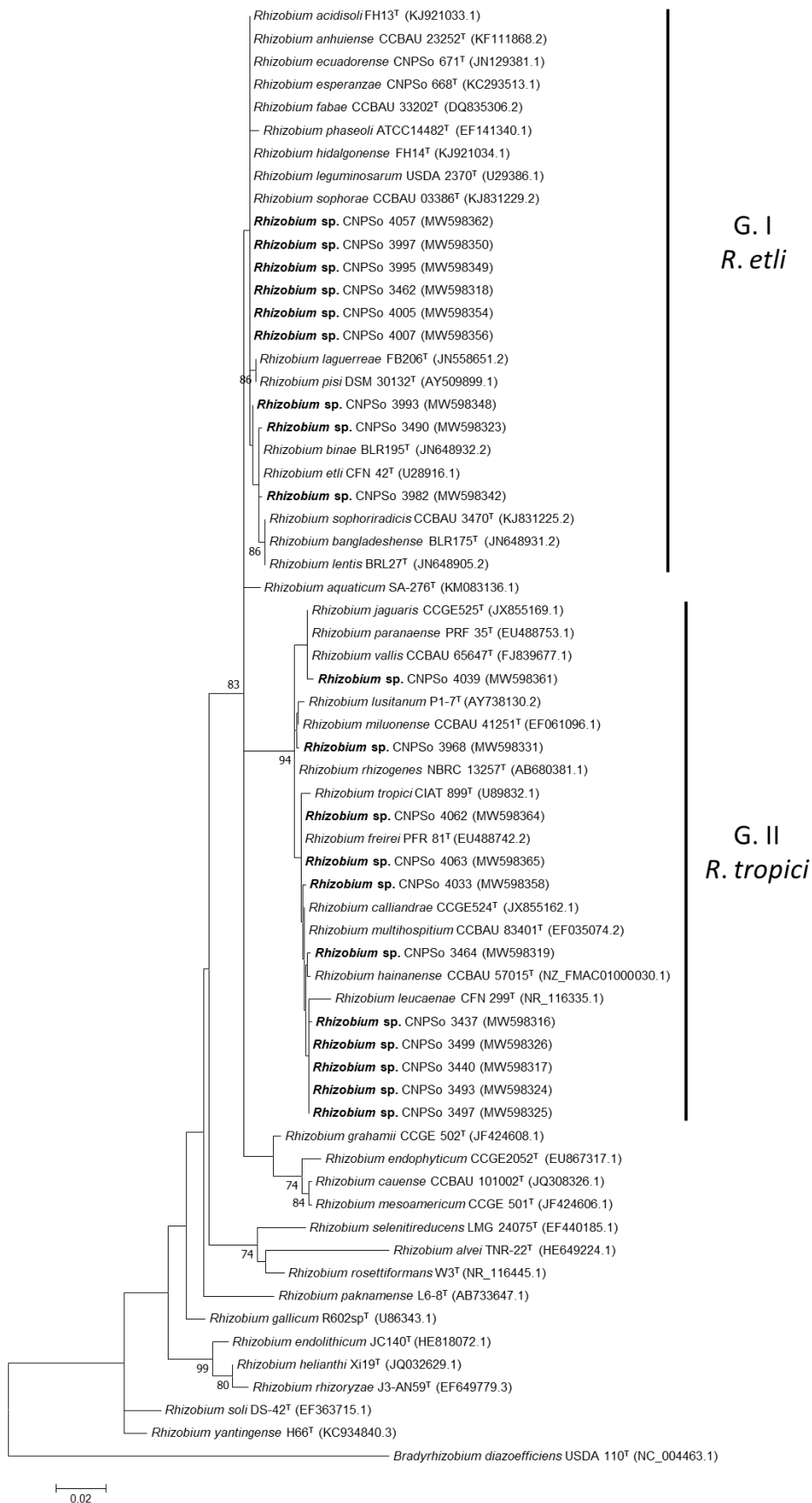
Na árvore com o gênero *Rhizobium* (Figura 7) foram formados dois grandes grupos. O grupo G.I agrupou nove estirpes *Rhizobium* spp. em estudo com 16 espécies do clado *R. etli*/*R. phaseoli*/*R. leguminosarum*, chamado de grupo *R. etli*, compartilhando IN de 98,4 a 100% O G.II agrupou 11 estirpes de *Rhizobium* spp. em estudo com 12 espécies que compõem o chamado grupo *R. tropici*, com 94% de suporte estatístico, e as estirpes compartilhando IN de 98 a 100% (Tabela 3).

A árvore com o gênero *Bradyrhizobium* (Apêndice A), foi composta pelas espécies do conhecido grande clado *B. japonicum*, juntamente com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. CNPSo 3435, que apresentou IN mais elevada com a espécie *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (99,7%). A árvore com o gênero *Mesorhizobium* (Apêndice B) agrupou a estirpe em estudo *Mesorhizobium* sp. CNPSo 3975 com as espécies *M. acaciae* RITF741<sup>T</sup>, *M. atlanticum* CNPSo 3140<sup>T</sup> e *M. plurifarium* LMG 11892<sup>T</sup>, todas compartilhando 100% de IN e 84% de suporte estatístico (Tabela 3).

**Figura 6** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (942 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Agrobacterium* (Máxima Verossimilhança, modelo Kimura-2-parâmetros (K2), com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas.



**Figura 7** - Árvore filogenética baseada em seqüências parciais do gene 16S RNAr (944 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Rhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G+I, com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas.



**Tabela 3** - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as espécies relacionadas baseado na análise filogenética do gene 16S RNAr.

Identidade Nucleotídica (%) 16S	Estirpe mais próxima	%
<b>Gênero <i>Agrobacterium</i></b>		
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4032	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4006	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3974	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3977	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3972	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3971	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3969	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4035	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	<i>A. pusense</i>	99,80
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3966	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3973	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3529	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4001	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3498	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3436	<i>A. arsenijevicii</i>	99,50
<b>Gênero <i>Rhizobium</i></b>		
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4057	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3997	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3995	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3462	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4005	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4007	<i>R. hidalgonense</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3993	<i>R. hidalgonense</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3490	<i>R. binae</i>	99,80
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3982	<i>R. binae</i>	99,80
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4039	<i>R. paranaense</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3968	<i>R. rhizogenes</i>	99,80
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4062	<i>R. freirei</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4063	<i>R. freirei</i>	100
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 4033	<i>R. freirei</i>	99,80
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3464	<i>R. multihospitum</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3437	<i>R. multihospitum</i>	99,60
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3499	<i>R. multihospitum</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3440	<i>R. multihospitum</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3493	<i>R. multihospitum</i>	99,70
<i>Rhizobium</i> sp. CNPSo 3497	<i>R. multihospitum</i>	99,70
<b>Gêneros <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Mesorhizobium</i></b>		
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CNPSo 3435	<i>B. japonicum</i>	99,70
<i>Mesorhizobium</i> sp. CNPSo 3975	<i>M. atlanticum</i>	100

**Fonte:** A própria autora

### 5.2.2. Análises do gene *housekeeping glnII*

Para obter uma definição taxonômica mais clara e melhor acessar a diversidade das estirpes, a filogenia do gene *housekeeping glnII* foi analisada. Novamente, quatro árvores filogenéticas foram construídas, com os gêneros *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, e os alinhamentos contaram com aproximadamente 337 pb, 504 pb, 516 pb e 346 pb, respectivamente. Com a metodologia utilizada não foi possível obter tamanho suficiente das sequências de *glnII* das estirpes *Agrobacterium* spp. CNPSo 3436 e 3498 e *Rhizobium* sp. CNPSo 3499, por isso, essas estirpes foram excluídas da análise.

Na árvore filogenética do gênero *Agrobacterium* (Figura 8) houve a formação de um grande grupo, com oito estirpes em estudo (CNPSo 4006, 4032, 3977, 3974, 3972, 3971, 4035 e 3969), novamente agrupadas com as espécies *A. pusense* NRCPB10<sup>T</sup> e *A. salinitolerans* YIC 5082<sup>T</sup>, compartilhando de 97,6 a 100% de IN (Tabela 4) com 74% de suporte estatístico. As outras cinco estirpes (CNPSo 4058, 3529, 3973, 3966 e 4001) ocuparam posições isoladas, compartilhando entre elas de 93,7 a 98,2% de IN e de 93,4 a 98,5% com a espécie mais próxima, *A. pusense* NRCPB10<sup>T</sup> (Tabela 4).

Na árvore com o gênero *Rhizobium* (Figura 9) houve a formação de dois grandes grupos. O grande grupo G.I relacionou nove estirpes em estudo com 15 espécies do grande clado *R. etli* e dois subgrupos foram formados; o G.I.I agrupou duas estirpes em estudo (CNPSo 3490 e 3982) compartilhando 96,5% de IN entre si e 97,3 e 94,4%, respectivamente, com a espécie mais próxima, *R. esperanzae* CNPSo 668<sup>T</sup>. O subgrupo G.I.II foi formado com sete estirpes em estudo (CNPSo 3462, 3995, 3993, 3997, 4005, 4057 e 4007) e a espécie *R. phaseoli* ATCC14482<sup>T</sup>, compartilhando de 97,9 a 100% de IN entre si e 100% de suporte estatístico (Tabela 5).

O segundo grande grupo (G.II) relacionou 10 estirpes em estudo com sete espécies do grande clado *R. tropici* e quatro subgrupos foram formados. O subgrupo G.II.I agrupou quatro estirpes em estudo (CNPSo 3497, 3493, 3440 e 3437) com a espécie *R. leucaenae* CFN 299<sup>T</sup>, compartilhando de 99,7 a 100% de IN e com suporte estatístico de 100%. O subgrupo G.II.II se posicionou próximo ao subgrupo G.II.I, compartilhando de 94,4 a 95% de IN, e agrupou a estirpe *Rhizobium* sp. CNPSo 3464 com a espécie *R. paranaense* PRF 35<sup>T</sup> (96,8% IN e 82% de suporte estatístico).

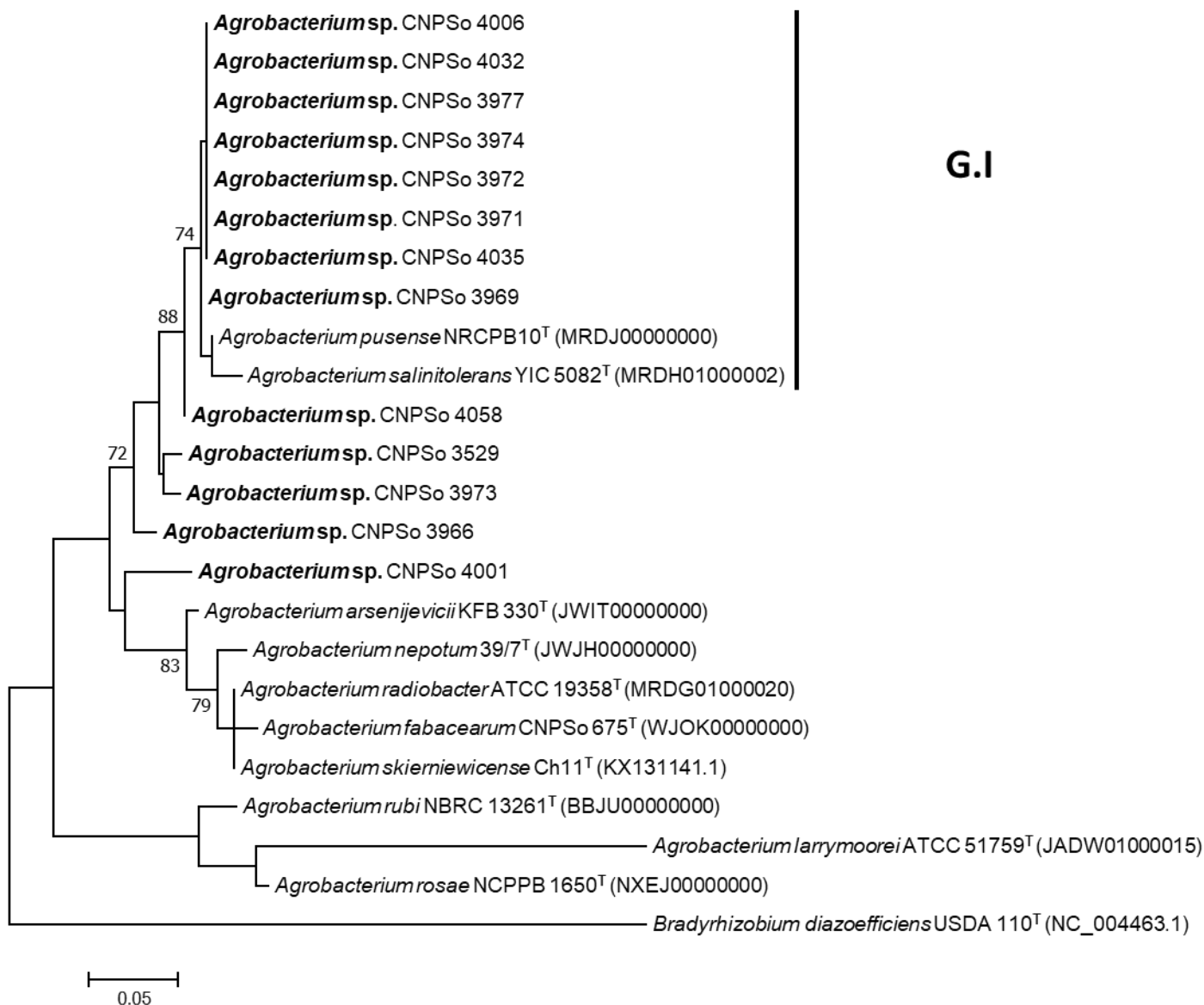
A estirpe *Rhizobium* sp. CNPSo 3968 ocupou posição isolada, apresentando

95% de IN com a espécie *R. hainanense* CCBAU 57015<sup>T</sup> e de 95,3 a 95,9% com o subgrupo G.II.IV. O subgrupo G.II.III agrupou as estirpes CNPSO 4033 e 4039, compartilhando de 97,3% de IN com um valor suporte estatístico de 74%, e com similaridade de 95 a 95,3%, respectivamente, com a estirpe CNPSO 3968. O último subgrupo formado (G.II.IV) agrupou as estirpes CNPSO 4062 e 4063 com IN de 98,8% e com suporte estatístico de 90% (Tabela 5).

Assim como na árvore filogenética do gene ribossomal 16S do gênero *Bradyrhizobium*, a estirpe em estudo CNPSO 3435, na árvore do gene *housekeeping glnII* (Apêndice C), ficou próxima da espécie *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, compartilhando 100% de IN e com 100% de suporte estatístico.

E, por fim, na árvore com o gênero *Mesorhizobium* (Apêndice D) a estirpe em estudo CNPSO 3975 ficou no mesmo ramo das espécies *M. atlanticum* CNPSO 3140<sup>T</sup>, *M. acaciae* RITF741<sup>T</sup> e *M. shonense* HAMBI 3295<sup>T</sup>, compartilhando IN de 96,1, 95,3 e 94,7%, respectivamente.

**Figura 8** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *housekeeping glnII* (337 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Agrobacterium* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G, com 1000 repetições *bootstrap*). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica cinco substituições por 100 posições nucleotídicas.

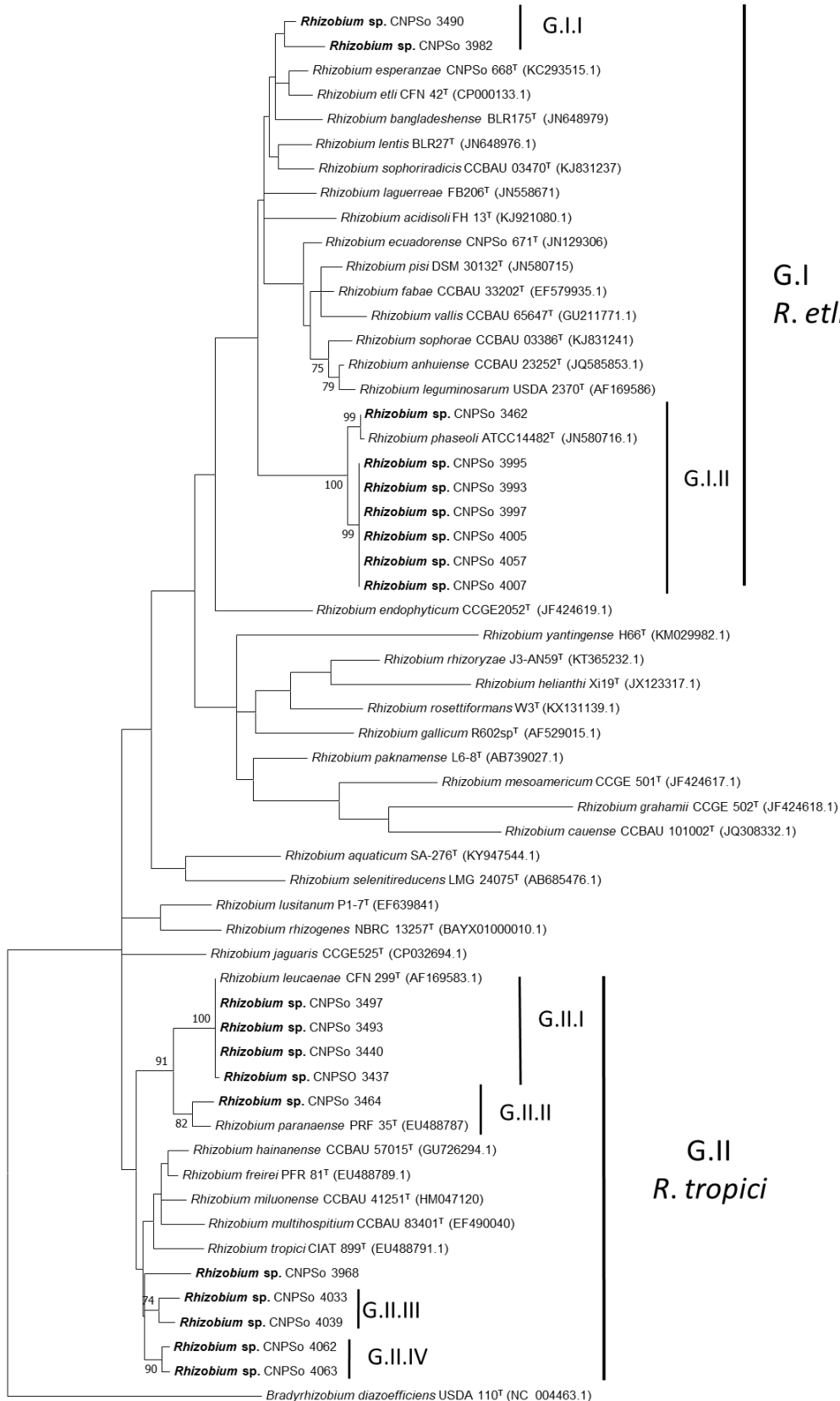


**Tabela 4** - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as estirpes relacionadas do gênero *Agrobacterium* baseado na análise filogenética do gene *housekeeping glnII*.

Identidade Nucleotídica (%)	
<i>GlnII</i>	
<b>G.I</b> (CNPSo 4006, 4032, 3977, 3974, 3972, 3971, 4035, 3969 <i>A. pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup> , <i>A. salinitolerans</i> YIC 5082 <sup>T</sup> )	
Entre o grupo	97,6 - 100
Entre o grupo e estirpes relacionadas	
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	97,6 - 99,1
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3529	95,8 - 96,7
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3973	95,8 - 96,7
<b>CNPSo 4058</b>	
Entre CNPSo 4058 e estirpes relacionadas	
G.I	97,6 - 99,1
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3969	99,1
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4035	98,5
<b>CNPSo 3529</b>	
Entre CNPSo 3529 e estirpes relacionadas	
G.I	95,8 - 96,7
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3973	98,2
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	97,6
<b>CNPSo 3973</b>	
Entre CNPSo 3973 e estirpes relacionadas	
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3529	98,2
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	97,6
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3966	97,0
<b>CNPSo 3966</b>	
Entre CNPSo 3966 e estirpes relacionadas	
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3973	97,0
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	96,4
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3529	96,4
<b>CNPSo 4001</b>	
Entre CNPSo 4001 e estirpes relacionadas	
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 4058	94,3
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3973	94,3
<i>Agrobacterium</i> sp. CNPSo 3966	94,0

**Fonte:** A própria autora

**Figura 9** - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *housekeeping glnII* (346 pb) das estirpes em estudo (em negrito) e espécies do gênero *Rhizobium* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei (TN93), com distribuição G + I, com 1000 repetições bootstrap). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas.



**Tabela 5** - Porcentagem da Identidade Nucleotídica (IN) entre as estirpes em estudo e as espécies relacionadas do gênero *Rhizobium* baseado na análise filogenética do gene *housekeeping glnII*.

Identidade Nucleotídica (%)	
<i>GlnII</i>	
<b>G.I.I (CNPSo 3490 e CNPSo 3982)</b>	
Entre o grupo	96,5
Entre o grupo e espécies relacionadas	
<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSo 668 <sup>T</sup>	94,4 - 97,3
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	94,4 - 96,2
<i>Rhizobium lentis</i> BLR27 <sup>T</sup>	94,7 - 95,9
<b>G.I.II (CNPSo 3462, <i>R. phaseoli</i> ATCC14482<sup>T</sup>, CNPSo 3995, CNPSo 3993, CNPSo 3997, CNPSo 4005, CNPSo 4057 e CNPSo 4007)</b>	
Entre o grupo	97,9 - 100
Entre o grupo e espécies relacionadas	
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>	92,4 - 92,7
<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSo 668 <sup>T</sup>	91,8 - 92,1
<i>Rhizobium lentis</i> BLR27 <sup>T</sup>	91,5 - 91,8
<b>G.II.I (<i>R. leucaena</i> CNF 299<sup>T</sup>, CNPSo 3497, CNPSo 3493, CNPSo 3440 e CNPSo 3437)</b>	
Entre o grupo	99,7 - 100
Entre o grupo e espécies relacionadas	
<b>G.II.II (CNPSo 3464 e <i>R. paranaense</i> PRF 35<sup>T</sup>)</b>	94,4 - 95,0
<i>Rhizobium freirei</i> PFR 81 <sup>T</sup>	93,0 - 93,3
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU 57015 <sup>T</sup>	92,4 - 92,7
<b>G.II.II (CNPSo 3464 e <i>R. paranaense</i> PRF 35<sup>T</sup>)</b>	
Entre o grupo	96,8
Entre o grupo e espécies relacionadas	
G.II.I	94,4 - 95,0
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU 57015 <sup>T</sup>	93,6 - 94,2
<i>Rhizobium freirei</i> PFR 81 <sup>T</sup>	94,2-94,4
<b>CNPSo 3968</b>	
Entre CNPSo 3968 e espécies relacionadas	
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <sup>T</sup>	94,4
<i>Rhizobium freirei</i> PFR 81 <sup>T</sup>	94,2
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	94,2
<b>G.II.III (CNPSo 4033 e CNPSo 4039)</b>	
Entre o grupo	97,3
Entre o grupo e espécies relacionadas	
<i>Rhizobium freirei</i> PFR 81 <sup>T</sup>	95,0 - 95,3
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	93,9 - 94,7
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <sup>T</sup>	93,3 - 94,2
<b>G.II.IV (CNPSo 4062 e CNPSo 4063)</b>	
Entre o grupo	98,8
Entre o grupo e espécies relacionadas	
<i>Rhizobium freirei</i> PFR 81 <sup>T</sup>	95,3
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 <sup>T</sup>	94,7 - 95,3
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <sup>T</sup>	94,7 - 95,3

**Fonte:** A própria autora

### 5.3. Caracterização Morfofisiológica

A caracterização morfofisiológica foi realizada com os 37 isolados identificados como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* e os resultados diferentes entre as estirpes estão listados na Tabela 6. Desses, 21 estirpes apresentaram crescimento rápido (3 dias), 14 apresentaram crescimento intermediário (4 dias) e duas estirpes apresentaram crescimento lento (6 e 7 dias). Em relação à alteração do pH do meio YMA com indicador azul de bromotimol, 33 estirpes atribuídas aos gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium* não apresentaram reação, mantendo o meio neutro. Já as estirpes CNPSo 3975, 3995 e 4057, atribuídas aos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, apresentaram reação ácida e a estirpe *Bradyrhizobium* CNPSo 3435 apresentou reação alcalina. Em relação à cromogênese das colônias em mesmo meio contendo vermelho Congo, 19 estirpes apresentaram coloração avermelhada, 10 estirpes apresentaram coloração rosada e oito estirpes apresentaram coloração branca. Já no meio contendo azul de bromotimol, 22 estirpes apresentaram coloração amarela e 15 estirpes apresentaram coloração creme.

Na avaliação das características de borda, superfície, forma e elevação das colônias todas as estirpes foram semelhantes, com borda e superfície lisa, com colônias circulares e de elevação convexa. Já o diâmetro das colônias variou de 1,4 mm até 4,0 mm e a produção de muco foi considerada moderada para 31 estirpes, pouca para 5 estirpes e abundante para a estirpe CNPSo 3977. Quanto aos detalhes ópticos, 21 estirpes manifestaram característica opaca e 16 translúcida. A consistência da massa de crescimento foi considerada gomosa para todas as estirpes testadas, exceto para as estirpes CNPSo 4005 e 4057, que apresentaram consistência viscosa.

**TABELA 6** – Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de *P. vulgaris*.

Isolados (CNPSO)	Gêneros	Crescimento <sup>1</sup>	Diâmetro colônias (mm)	pH BTB <sup>2</sup>	Produção de muco	Consistência	Detalhes ópticos	Cromogênese em BTB <sup>2</sup>	Cromogênese em VC <sup>3</sup>
3435	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Lento	1,4	Alcalino	Pouco	Gomosa	Opaco	Creme	Rosada
3436	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	2,9	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Rosada
3437	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,5	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Branca
3440	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,4	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3462	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,5	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Branca
3464	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	3,6	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3490	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	1,5	Neutro	Pouco	Gomosa	Translúcido	Amarela	Avermelhada
3493	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	1,9	Neutro	Pouco	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3497	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,1	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3498	<i>Agrobacterium</i> sp.	Intermediário	2,4	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3499	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,7	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Creme	Branca
3529	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
3966	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	2,8	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
3968	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,3	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
3969	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,4	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Avermelhada
3971	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,6	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Rosada
3972	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,7	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
3973	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
3974	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	2,7	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
3975	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Lento	2,5	Ácido	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
3977	<i>Agrobacterium</i> sp.	Intermediário	4	Neutro	Abundante	Gomosa	Translúcido	Creme	Avermelhada
3982	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2,3	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
3993	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	3,4	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
3995	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,5	Alcalino	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
3997	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	2	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4001	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,1	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Rosada
4005	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,1	Neutro	Moderado	Viscosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4006	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,8	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4007	<i>Rhizobium</i> sp.	Intermediário	1,6	Neutro	Pouco	Gomosa	Opaco	Creme	Avermelhada

**Tabela 6:** Continuação...

Isolados (CNPSO)	Gêneros	Crescimento <sup>1</sup>	Diâmetro colônias (mm)	pH BTB <sup>2</sup>	Produção de muco	Consistência	Detalhes ópticos	Cromogênese em BTB <sup>2</sup>	Cromogênese da colônia em VC <sup>3</sup>
4032	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,6	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4033	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,6	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4035	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,3	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Rosada
4039	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,8	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Amarela	Avermelhada
4057	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	1,7	Ácido	Pouco	Viscosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4058	<i>Agrobacterium</i> sp.	Rápido	3,1	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Avermelhada
4062	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,6	Neutro	Moderado	Gomosa	Opaco	Amarela	Avermelhada
4063	<i>Rhizobium</i> sp.	Rápido	2,1	Neutro	Moderado	Gomosa	Translúcido	Creme	Avermelhada

<sup>1</sup>Rápido: até 3 dias; Intermediário: de 4 a 5 dias; Lento: 6 de 9 dias

<sup>2</sup>ABT: Azul de Bromotimol

<sup>3</sup>VC: Vermelho Congo

**Fonte:** A própria autora

#### 5.4. Capacidade de nodulação e eficiência da fixação de nitrogênio

As 37 estirpes classificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* foram avaliadas quanto à capacidade de nodulação e a eficiência dos nódulos quando em simbiose com *Phaseolus vulgaris*, e os resultados podem ser visualizados na Tabela 7. Das 37 estirpes testadas, 13 foram capazes de nodular a planta hospedeira. Dessas 13 estirpes, com exceção da CNPSo 4005, classificada no clado *R. etli*, que apresentou coloração interna branca, todas as demais apresentaram nódulos eficientes, com coloração interna rosa ou vermelha.

**Tabela 7** - Capacidade de nodulação e eficiência das estirpes em estudo em simbiose com *P. vulgaris*

Teste de Nodulação				Teste de Nodulação			
Estirpe	Clado	Nodulação	Fixação	Estirpe	Clado	Nodulação	Fixação
3435	<i>B. japonicum</i>	-	-	3975	<i>Mesorhizobium</i>	-	-
3436	<i>Agrobacterium</i>	-	-	3977	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3437	<i>R. tropici</i>	+	+	3982	<i>R. etli</i>	+	+
3440	<i>R. tropici</i>	+	+	3993	<i>R. etli</i>	+	+
3462	<i>R. etli</i>	+	+	3995	<i>R. etli</i>	-	-
3464	<i>R. tropici</i>	+	+	3997	<i>R. etli</i>	+	+
3490	<i>R. etli</i>	+	+	4001	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3493	<i>R. tropici</i>	+	+	4005	<i>R. etli</i>	+	-
3497	<i>R. tropici</i>	+	+	4006	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3498	<i>Agrobacterium</i>	+	+	4007	<i>R. etli</i>	-	-
3499	<i>R. tropici</i>	+	+	4032	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3529	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4033	<i>R. tropici</i>	-	-
3966	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4035	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3968	<i>R. tropici</i>	-	-	4039	<i>R. tropici</i>	-	-
3969	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4057	<i>R. etli</i>	-	-
3971	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4058	<i>Agrobacterium</i>	-	-
3972	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4062	<i>R. tropici</i>	-	-
3973	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4063	<i>R. tropici</i>	-	-
3974	<i>Agrobacterium</i>	-	-				

Nodulação: + presença de nódulos

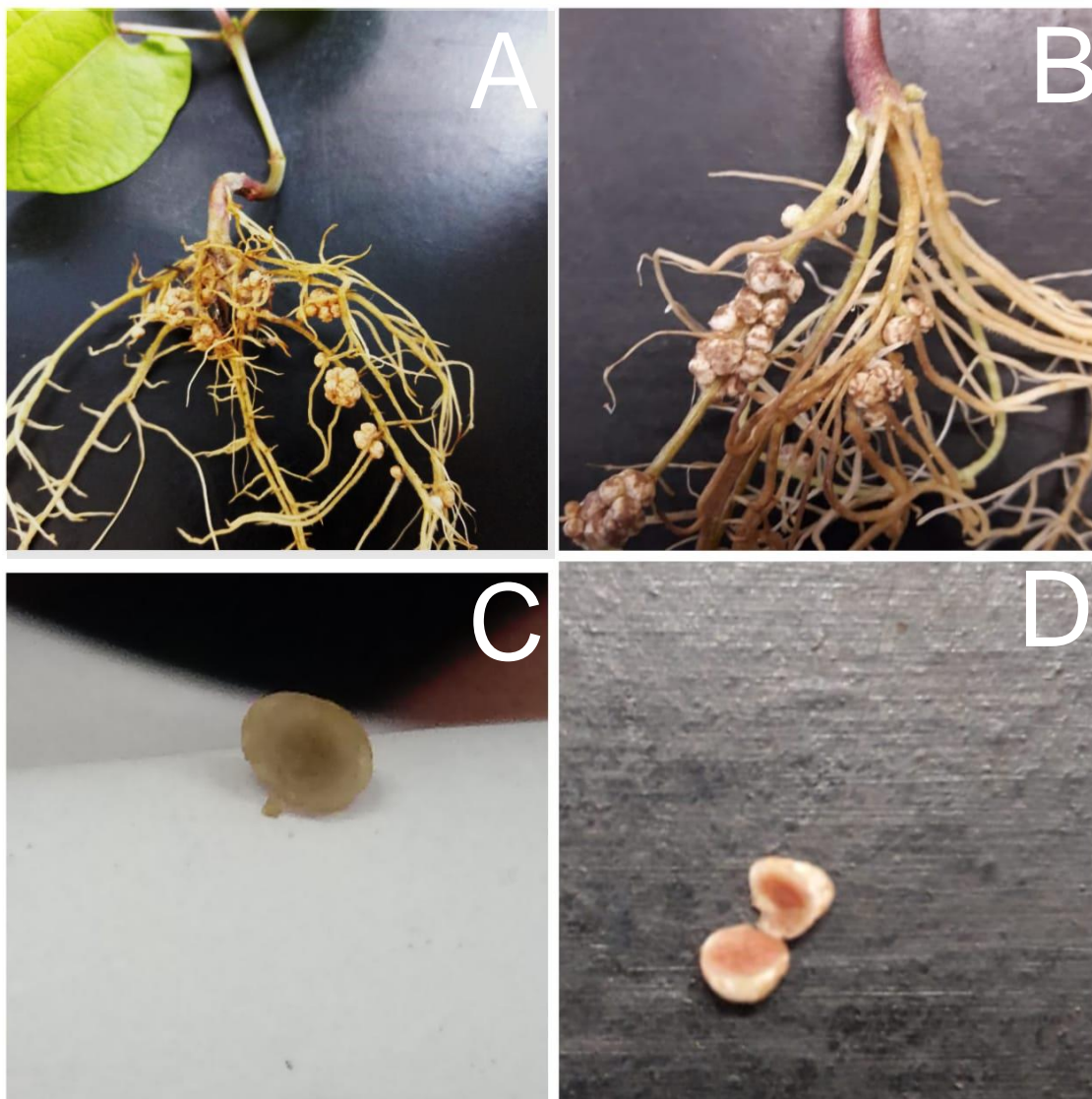
Nodulação: - ausência de nódulos

Fixação: + nódulos vermelhos/rosa (presença de hemoglobina, houve fixação)

Fixação: - nódulos brancos (não houve fixação)

**Fonte:** A própria autora

**Figura 10** - Nódulos formados em diferentes estirpes e interior do nódulo com coloração branca e rosa.



**Fonte:** A própria autora

## 6. DISCUSSÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do mundo e, além de grande importância econômica, a leguminosa representa a principal fonte de proteínas na dieta da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento (REYES-MORENO *et al.*, 1993; MYERS *et al.*, 2017; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

O nitrogênio é essencial para o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas, inclusive do feijoeiro. A FBN possibilitada pela simbiose de rizóbios com leguminosas representa um processo biológico de alta relevância para a agricultura (BARGAZ *et al.*, 2018; DICENZO *et al.*, 2018). Contudo, para encontrar linhagens elites no processo de fixação do nitrogênio, são necessários estudos para acessar a diversidade e identificar e caracterizar potenciais rizóbios eficientes (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013b).

O estado do Mato Grosso do Sul (MS) engloba três biomas, Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, considerados *hotspots* de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000; MERCANTE; OTSUBO; BRITO, 2017). Neste estudo, em 14 municípios do MS, foi constatada uma alta diversidade genética pela análise de BOX-PCR entre as 82 estirpes, 36 ocupando posições isoladas e 12 grupos, considerando um valor de corte de 70% de similaridade (Figura 5), conforme sugerido em estudos anteriores (KASCHUK *et al.* 2006; DALL'AGNOL *et al.*, 2017; CHIBEBA *et al.*, 2020). Com base na análise de BOX-PCR, pode-se afirmar que das 82 estirpes apenas sete perfis entre 19 estirpes representaram prováveis clones.

Em relação à biogeografia, apenas as estirpes provenientes dos municípios de Amambaí (1) e Douradina (5) ficaram isoladas no dendrograma, e os agrupamentos foram formados com estirpes provenientes dos outros 12 municípios. Além disso, 19 estirpes dos municípios de Bataguassú (3), Dourados (6), Itaquiraí (9), Ivinhema (10) e Novo Horizonte do Sul (13) apresentaram apenas sete perfis genéticos, indicando a presença de possíveis clones, compartilhando 100% de similaridade. Costa e colaboradores (2018) realizaram um estudo com 73 isolados de 22 municípios do MS, no qual também foi confirmada alta diversidade genética, com 16 grupos formados e 19 ocupando

posições isoladas. Tais resultados confirmam o Mato Grosso do Sul como *hotspot* também da diversidade de microrganismos que se associam ao feijoeiro. Quando 54 isolados selecionados da análise de BOX-PCR foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S RNAr, 37 foram confirmados como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium*. Os demais foram identificados como pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*. Há diversos estudos indicando a presença de bactérias endofíticas distintas de rizóbios nos nódulos e incapazes de nodulação, por exemplo, em *Phaseolus lunatus* (Chibeba *et al.*, 2020), em soja (Li *et al.*, 2008; Zhao; Xu; Lai, 2017; Delamuta *et al.*, 2020) e mesmo em feijoeiro comum (Wang *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017b; Delamuta *et al.*, 2020), dentre outras leguminosas (ASERSE *et al.*, 2013; TARIQ *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2017b). Possíveis papéis sugeridos para as bactérias endofíticas envolvem a promoção do crescimento de plantas, especialmente crescimento da raiz, ajudando na aquisição de nutrientes, o que pode facilitar no processo de nodulação (DUDEJA *et al.*, 2011; CHIBEBA *et al.*, 2020; DELAMUTA *et al.*, 2020).

Dos 14 municípios onde os solos foram coletados, Ivinhema e Laguna Carapã não apresentaram “rizóbios clássicos” ou *Agrobacterium* para serem incluídos nas análises filogenéticas. Costa e colaboradores (2018), nesses mesmos dois municípios do MS, encontraram bactérias fixadoras de nitrogênio apenas no município de Laguna Carapã. O território de Ivinhema e Laguna Carapã é composto 100% pelo bioma Mata Atlântica, que é reconhecido como um dos biomas mais heterogêneos em relação à existência de plantas e animais, e abriga uma diversidade significativa, confirmando a necessidade de mais estudos neste estado, principalmente nestes municípios (EISENLOHR; OLIVEIRA-FILHO; PRADO, 2015; INFOSANBAS, 2021).

O maior interesse deste trabalho era o aprofundamento no estudo de “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium*. O gênero *Rhizobium* apresenta distribuição global, sendo capaz de formar associações simbióticas com diferentes leguminosas, incluindo o feijoeiro (KASCHUK; HUNGRIA, 2017). O gênero *Bradyrhizobium* pode se associar de forma simbiótica e endofítica com leguminosas e não leguminosas, e é o gênero mais representativo em algumas culturas de interesse econômico, como é o caso da soja (ISLAM *et al.*, 2008; MENNA; HUNGRIA, 2011). O gênero *Mesorhizobium*, por sua vez, nodula com

uma grande variedade de leguminosas, como o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) que tem alta importância agrônômica em diversos países, assim como espécies de *Acacia*, *Alhagi*, *Lotus* e *Phaseolus vulgaris* (LARANJO *et al.*, 2008; KASCHUK; HUNGRIA, 2017). Já o gênero *Agrobacterium* inclui várias espécies comumente encontradas no solo, em geral patogênicas, capazes de formar tumores nos caules e raízes de plantas e árvores, mas o gênero também inclui estirpes não patogênicas (SINGH; PRASAD, 2016; BARTON; FUQUA; PLATT, 2017), como é o caso da *Agrobacterium fabacearum* (DELAMUTA DELAMUTA *et al.*, 2020).

Neste estudo, os genes 16S RNAr e *housekeeping glnII* foram utilizados para confirmar a identificação das estirpes classificadas como “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* (Figuras 6,7,8 e 9). As árvores filogenéticas foram congruentes, mas a definição filogenética foi incrementada com a análise do gene *housekeeping glnIII*, comprovando que a utilização de apenas um gene *housekeeping* é capaz de incrementar a definição filogenética e taxonômica de rizóbios, conforme já constatado em estudo realizado por Roma Neto; Ribeiro; Hungria (2010) que teve por objetivo esclarecer as relações filogenéticas de estirpes elites de várias leguminosas hospedeiras.

O clado *R. tropici* tem sido encontrado em regiões tropicais de solos ácidos e se caracteriza por apresentar elevada estabilidade genética nessas condições ambientais, que incluem temperaturas elevadas e acidez do solo (GOMES *et al.*, 2012; GOMES; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015). Neste estudo, cinco estirpes se agruparam com *R. leucaenae*, apresentando altos valores de IN e suporte estatístico. Estudos anteriores relataram grande número de isolados de *R. leucaenae* nos Cerrados (Mostasso *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2012; Gomes; Ormeño-Orrillo; Hungria, 2015). Também foram encontrados em estudo no MS (MERCANTE *et al.*, 1998), embora a planta-isca usada tenha sido *Leucaena leucocephala* e, depois, a nodulação em feijoeiro foi confirmada. Já quando a planta-isca utilizada foi o feijoeiro, Costa *et al.* (2018) isolaram uma única estirpe de *R. leucaenae* em solos do MS. Esses dados dão suporte à hipótese de que outra leguminosa e não o feijoeiro seja a hospedeira original de *R. leucaena*.

Nove estirpes de nosso estudo foram posicionadas no clado *R. etli*. A espécie *R. phaseoli* (Dangeard, 1926) foi a primeira descrita nodulando

*Phaseolus vulgaris* nos Estados Unidos, sendo posteriormente transferida para uma nova espécie isolada do México, denominada *R. etli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993). Em 2008, Ramírez-Bahena e colaboradores comprovaram que as espécies *R. phaseoli* e *R. etli* eram distintas com base em seus genes *housekeeping recA* e *atpD*. Essas duas espécies são capazes de nodular *P. vulgaris* na América, onde os centros genéticos de origem desta leguminosa estão localizados (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020).

As árvores filogenéticas do 16S RNAr e *glnII* relacionadas aos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* foram bastante congruentes, entretanto, a estirpe *Mesorhizobium* sp. CNPSo 3975, que na filogenia do gene ribossomal 16S (Apêndice B) ficou agrupada com as espécies *M. acaciae* RITF741<sup>T</sup> isolada de *Acacia* na China, *M. atlanticum* CNPSo 3140<sup>T</sup> isolada de *Phaseolus vulgaris* no Rio de Janeiro e *M. plurifarum* LMG 11892<sup>T</sup> isolada de *Acacia* no Senegal, na filogenia do gene *housekeeping glnII* (Apêndice D) apresentou posição isolada, estando mais próxima de *M. atlanticum*, compartilhando 96,1% de IN. Vale a pena ressaltar, que a *M. atlanticum* foi isolada de uma região coberta por vegetação do Bioma Mata Atlântica, mais precisamente em Seropédica, no Rio de Janeiro. Contudo, quando inoculadas novamente, nenhuma das duas estirpes deste estudo (*Mesorhizobium* CNPSo 3975 e *Bradyrhizobium* CNPSo 3435) foi capaz de nodular o feijoeiro.

Segundo Konstantinidis; Ramette; Tiedje (2006), baseando-se em apenas um gene *housekeeping*, o valor de referência para que duas estirpes sejam consideradas da mesma espécie é de 94% de IN

Ao analisar os ramos formados nas árvores filogenética do *glnII* (Figura 8, Figura 9 e Apêndice D), algumas estirpes apresentaram valores de IN  $\geq$  95% com espécies de referência (Tabela 4), porém, ocupando posições isoladas. Como exemplo, as estirpes *Agrobacterium* spp. CNPSo 4058, 3529, 3973, 3966 e 4001, estirpes de *Rhizobium* spp. CNPSo 3490, 3982, 3968, 4033, 4039, 4062 e 4063 e *Mesorhizobium* sp. CNPSo 3975, o que pode indicar potenciais novas espécies. Para tanto, análises filogenéticas mais robustas, como o MLSA são necessárias para alcançar a real posição filogenética dos isolados em questão.

Em relação às características morfofisiológicas, as 37 estirpes de “rizóbios clássicos” e *Agrobacterium* exibiram características semelhantes aos gêneros *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, como

tempo de crescimento, consistência da massa, elevação e forma. Em relação à alteração de pH em meio YMA com indicador azul de bromotimol, as reações ácida e neutra são atribuídas aos gêneros *Agrobacterium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, e a reação alcalina ao gênero *Bradyrhizobium* (CHEN; WANG; KUYKENDALL, 2015; O'HARA; ZILLI; POOLE; HUNGRIA, 2016; KLEPA *et al.*, 2019), conforme constatado com as estirpes deste estudo.

No teste de nodulação, das 37 estirpes testadas, 13 foram capazes de nodular a planta hospedeira, seis posicionadas no clado *R. etli* nas análises de 16S RNAr e *glnII* (CNPSo 3462, 3490, 3982, 3993, 3997 e 4005), outras seis no clado *R. tropici* nas análises de 16S RNAr e *glnII* (CNPSo 3437, 3440, 3464, 3493, 3497, 3499) e a estirpe CNPSo 3498, classificada como *Agrobacterium* no 16S RNAr. Destas, 12 estirpes representantes dos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium* apresentaram capacidade de nodular a planta hospedeira com nódulos de coloração interna rósea, típica de nódulos eficientes na fixação de nitrogênio com leghemoglobina ativa. Foi sugerido que as espécies do clado *R. tropici* provavelmente têm origem nas regiões andinas na América do Sul, enquanto *R. etli* nas regiões mesoamericanas e no norte da Argentina, na América do Sul (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). Embora haja relato de estirpes de *R. etli* nos solos brasileiros, foi constatado que elas apresentam baixa capacidade de competição quanto comparadas com as espécies do clado *R. tropici*, além de baixa estabilidade do plasmídeo simbiótico em condições tropicais; conseqüentemente, as espécies do clado *R. tropici* são utilizadas na produção de inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro comum no Brasil (GOMES; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015). É interessante comentar, também, que *Agrobacterium* sp. CNPSo 3498 foi capaz de apresentar nódulos eficientes. Em geral, estirpes de *Agrobacterium* isoladas de nódulos de leguminosas não são capazes de reinfetar, ou de formar nódulos eficientes, de modo que seria interessante desenvolver mais estudos com a estirpe CNPSo 3498.

## 7. CONCLUSÕES

Foi possível constatar grande diversidade genética inter e intraespecífica em bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro cultivado em solos de 14 municípios do Mato Grosso do Sul. Na análise do gene 16S RNAr, 31,5% das estirpes foram identificadas como endofíticas não simbióticas pertencentes a seis gêneros, 27,8% como *Agrobacterium* e 40,7% como “rizóbios clássicos”. Somente 54,5% dos “rizóbios clássicos” foram capazes de reinfestar o feijoeiro, formando nódulos eficientes na fixação de nitrogênio, posicionados no clado *R. etli* e no clado *R. tropici* e uma estirpe de *Agrobacterium*. Os resultados evidenciam a alta promiscuidade do feijoeiro, com colonização dos nódulos com uma variedade de espécies que não fixam nitrogênio, limitando a contribuição para a nutrição nitrogenada da cultura.

## REFERÊNCIAS

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules.

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.

ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASSEFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 120-131, 2012.

ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10117-10134, 2013.

ASERSE, A. A.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; WHITMAN, W. B.; LINDSTRÖM, K. Draft genome sequence of type strain HBR26 T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 14, 2017.

BARGAZ, A.; LYAMLOULI, K.; CHTOUKI, M.; ZEROUAL, Y.; DHIBA, D. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1606, 2018.

BARTON, I. S.; FUQUA, C.; PLATT, T. G. Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 16-29, 2017.

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 25 março 2020.

BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation In: GARRITY, G.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Springer, Boston, MA, 2005. P. 27-32.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemical Journal**, v. 125, n. 4, p. 1075-1080, 1971.

BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.

CHEN, W. X.; WANG, E. T.; KUYKENDALL, L. D. *Mesorhizobium*. In: TRUJILLO, M. E.; DEDYSH, S.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; KÄMPFER, P.; RAINEY, F. A.; WHITMAN, W. B. (Eds.) **Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1-11, 2015.

CHIBEBA, A. M.; KYEI-BOAHEN, S.; DE FÁTIMA GUIMARÃES, M.;

NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 246, p. 291-305, 2017.

CHIBEBA, A. M.; PEREIRA, C. S.; ANTUNES, J. E. L.; RIBEIRO, R. A.; DE ALMEIDA LOPES, A. C.; GOMES, R. L. F.; ARAUJO, A. S. F. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, v.80, p.279–292, 2020.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p.833–840, 2003.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; DA COSTA, M. S.; TRUJILLO, M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 461-466, 2018.

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, n. 1, p. 410-433, 1970.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira, V. 8 – SAFRA 2020/21 – N. 3** – terceiro levantamento. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> Acesso em: 11 jan. 2021.

CORDEIRO, A. B.; RIBEIRO, R. A.; HELENE, L. C. F.; HUNGRIA M. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 3937-3945, 2017.

COSTA, M. R.; CHIBEBA, A. M.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M. Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 163-176, 2018.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; DE FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, p. fix027, 2017.

DALL'AGNOL, R. F.; PLOTTEGHER, F.; SOUZA, R. C.; MENDES, I. C.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M.

*Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian "Cerradão". **FEMS Microbiology Ecology**, p. fiw108, 2016.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3222-3229, 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* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4167-4173, 2013.

DANGEARD, P. A. C. **Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses**. Impr. Jouve et cie., 1926.

DA SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 175-182, 2012.

DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 312-320, 2009.

DELAMUTA, J. R. M.; MENNA, P.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Systematic and applied microbiology**, v. 40, n. 5, p. 254-265, 2017.

DELAMUTA, J. R. M., RIBEIRO, R. A., ARAÚJO, J. L. S., ROUWS, L. F. M., ZILLI, J. É., PARMA, M. M.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3078-3087, 2016.

DELAMUTA, J. R. M.; SCHERER, A. J.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of *Agrobacterium* species isolated from nodules of common bean and soybean in Brazil, Mexico, Ecuador and Mozambique, and description of the new species *Agrobacterium fabacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4233-4244, 2020.

DICENZO, G. C.; ZAMANI, M.; CHECCUCCI, A.; FONDI, M.; GRIFFITTS, J. S.; FINAN, T. M.; MENGONI, A. Multidisciplinary approaches for studying

rhizobium–legume symbioses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1-33, 2019.

DUDEJA, S. S.; GIRI, R.; SAINI, R.; SUNEJA-MADAN, P.; KOTHE, E. Interaction of endophytic microbes with legumes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 248-260, 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EISENLOHR, P. V.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PRADO, J. The Brazilian Atlantic Forest: new findings, challenges and prospects in a shrinking hotspot. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2129–2133, 2015.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

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

FERGUSON, B. J.; INDRASUMAR, A.; HAYASHI, S.; LIN, Y. R.; LIN, Y. H.; REID, D. E.; GRESSHOFF, P. M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 61-76, 2010.

FLORES-FÉLIX, J. D.; CARRO, L.; VELÁZQUEZ, E.; VALVERDE, A.; CERDA-CASTILLO, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 821-826, 2013.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n.2, p. 280-300, 2004.

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. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733, 2005.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015.

GOMES, D. F.; DA SILVA BATISTA, J. S.; TORRES, A. R.; DE SOUZA ANDRADE, D.; GALLI-TERASAWA, L. V.; HUNGRIA, M. Two-dimensional proteome reference map of *Rhizobium tropici* PRF 81 reveals several symbiotic determinants and strong resemblance with agrobacteria. **Proteomics**, v. 12, n. 6, p. 859-863, 2012.

GOMES, D. F.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M. Biodiversity, symbiotic

efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. vol.2, chapter 74. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p.747-756, 2015.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 1389-1398, 2004.

HAAG, A. F.; ARNOLD, M. F. F.; MYKA, K.K.; KERSCHER, B.; DALL'ANGELO, S.; ZANDA, M.; MERGAERT, P.; FERGUSON, G. P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 364-383, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAN, S. Z.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campyilotropis* and *Cassia* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 265-276, 2005.

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, n. 2, p. 366-369, 1992.

HELENE, L. C. F.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M. *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 1800-1806, 2019.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014.

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

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.; MENDES, I. C.; MERCANTE F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono**: avaliação nas culturas do feijoeiro e da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2013a. 22 p. (Embrapa Soja. Documentos, 337).

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE F. M. **Tecnologia de fixação biológica do nitrogênio com o feijoeiro**: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas Londrina: Embrapa Soja, 2013b. 30 p. (Embrapa Soja. Documentos, 338).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do N<sub>2</sub> na cultura do feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 187-294.

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-CNPAF/EMBRAPA-CNPSO/EMBRAPA-SPI, 1994.

HUO, Y.; TONG, W.; WANG, J.; WANG, F.; BAI, W.; WANG, E.; SHI, P.; CHEN, W.; WEI, G. *Rhizobium chutanense* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 2049-2056, 2019.

IBGE. Lista\_Municipio\_Bioma\_250mil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 04 fevereiro 2021.

IBGE. Biomas\_e\_sistemas\_costeiro\_marinho\_250mil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 outubro 2020.

INFOSANBAS. Disponível em: <https://infosanbas.org.br>. Acesso em: 05 fevereiro 2021

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote island in Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 72, n. 6, p. 1416–1429, 2008.

JACCARD, P. The distribution of the flora in the alpine zone. 1. **New Phytologist**, v. 11, n. 2, p. 37-50, 1912.

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, n. 1, p. 136-139, 1982.

KÄMPFER, P.; GLAESER, S. P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 291-317, 2012.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustain ability in the tropics. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Eds.). **Diversity and Benefits of Microorganisms From the Tropics**. Part III. Springer International Publishing, p. 269-292, 2017.

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.

KIM, M.; OH, H. S.; PARK, S. C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 346–351, 2014.

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.

KLEPA, M. S.; DE OLIVEIRA URQUIAGA, M. C.; SOMASEGARAN, P.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium niftali* sp. nov., an effective nitrogen-fixing symbiont of partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene], a native caesalpinoid legume broadly distributed in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 3448-3459, 2019.

KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. In: DILWORTH, M.J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Cap. 5. p. 117-152. Springer, Dordrecht, 2008.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7286-7293, 2006.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1879, 2016.

LAPAGE, S.P.; SNEATH P.H.A.; LESSEL E.F.; SKERMAN V.B.D.; SEELIGER H.P.R.; CLARK W.A. **International Code of Nomenclature of Bacteria: bacteriological code** (1990 Revision). Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 232, 1992.

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; OLIVEIRA, S. Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 2, p. 391-400, 2008.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of

soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 322-327, 2010.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; BAROIS, I.; ORTIZ-CEBALLOS, A. L.; MARTÍNEZ, J.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, *siratro*, *cowpea* and *Mimosa pudica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2264-2271, 2012.

LPSN. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net>. Acesso em: 15 fevereiro 2021.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 155-173, 1994.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525-4529, 1992.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; SALAZAR-SALAZAR, C.; MÉNDEZ, R. D.; CABALLERO-MELLADO, J.; HIRSCH, A. M.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p. 1063-1071, 2013.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.

MAUNOURY, N.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E.; MERGAERT, P. Cell biology of nodule infection and development. In: DILWORTH, M.J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses**. Cap. 6. P. 153-189. Institut des Sciences du Végétal. 2008.

MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 3052-3067, 2011.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. D.; STRALIOTTO, R.; QUADROS, W.; JUNIOR, R.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strain from the Brazilian cerrado region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 49-58, 1998.

MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R. New native rhizobia strains for inoculation of common bean in the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, e0150120, 2017.

MNASRI, B.; LIU, T. Y.; SAIDI, S.; CHEN, W.F.; CHEN, X. W.; ZHANG, X. X.; MAHMDI, R. *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1501-1506, 2014.

MNASRI, B.; SAÏDI, S.; CHIHAOUI, S. A.; MHAMDI, R. *Sinorhizobium americanum* symbiovar mediterraneanense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 263-269, 2012.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MOORE, E. R.; MIHAYLOVA, S. A.; VANDAMME, P.; KRICHEVSKY, M. I.; DIJKSHOORN, L. Microbial systematic and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 430-438, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora Ufla, 2002. p. 449-541.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2-3, p. 121-132, 2002.

MOUSAVI, S. A.; WILLEMS, A.; NESME, X.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTRÖM, K. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2015.

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; COSTAS, A. G.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; UDVARDI, M. K. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698–3710, 2016.

MYERS, J. R.; KMIECIK, K. Common bean: Economic importance and relevance to biological science research. In: PÉREZ DE LA VEGA M.; SANTALLA M.; MARSOLAIS F. (Eds) **The common bean genome**. Springer, Cham., p.1-20, 2017.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

O'HARA, G. W.; ZILLI, J. E.; POOLE, P. S., HUNGRIA, M. Taxonomy and physiology of rhizobia. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, p. 125-144, 2016.

OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519- 546, 2008.

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, p. 427-451, 2013.

OTT, T.; VAN DONGEN, J. T.; GU, C.; KRUSSELL, L.; DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; UDVARDI, M. K. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current Biology**, v. 15, n. 6, p. 531-535, 2005.

PAULITSCH, F.; KLEPA, M. S.; DA SILVA, A. R.; DO CARMO, M. R. B.; DALL'AGNOL, R. F.; DELAMUTA, J. R. M.; DA SILVA BATISTA, J. S. Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating native *Mimosa gymans* grown in a South Brazilian ecotone. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 529-540, 2019.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.

RAMASAMY, D.; MISHRA, A. K.; LAGIER, J. C.; PADHMANABHAN, R.; ROSSI, M.; SENTAUSA, E.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacteria species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 384-391, 2014.

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 (= NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 2484-2490, 2008.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

RASCIO, N.; ROCCA, N. Biological nitrogen fixation. In: SVEN ERIK, J.; BRIAN, D. F. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier, 2013.

REYES-MORENO, C.; PAREDES-LÓPEZ, O.; GONZALEZ, E. Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 227-286, 1993.

REMIGI, P.; ZHU, J.; YOUNG, J. P. W.; MASSON-BOIVIN, C. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016.

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, n. 4, p. 297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A.; MARTINS, T. B.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DELAMUTA, J. R. M.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA M. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3162-3169, 2015.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LOPEZ-LOPEZ, A. ORMENO-ORRILLO, E. BARCELLOS, F. G.; MARTINEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTINEZ-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, n. 5, p. 1179-1184, 2012.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MORA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 19126-19131, 2009.

ROMA NETO, I. V. R.; 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 and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1291-1302, 2010.

ROMÁN-PONCE, B.; ZHANG, Y. J.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; PADILLA, J. C. A.; GUO, X. W.; GAO, J. L.; YAN, J.; WEI, G. E. H.; WANG, E. T. *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 398-406, 2016.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 209-216, 2015.

ROUHRAZI, K.; KHODAKARAMIAN, G.; VELÁZQUEZ, E. Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 5, 2016.

SANTOS, M. S., NOGUEIRA, M. A., HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-22, 2019.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 484-486, 1984.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 374-377, 1993.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 63, p. 63, 2020.

SINGH, R. K.; PRASAD, M. Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of graminaceous crops. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 691-707, 2016.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. W.H Freeman & Co, San Francisco, USA, 1973.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: Methods in**

legume-rhizobium technology. New York, United States: Springer-Verlag, 1994. 450 p.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology Today**, v. 33, n. 4, p. 152, 2006.

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

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiossantes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1107-1120, 2008.

STRALIOTTO, R. Diversidade do rizóbio—evolução dos estudos taxonômicos. In: AQUINO, A. M. D.; ASSIS, R. L. (Eds.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 221-255, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Assimilação de nutrientes inorgânicos. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento vegetal** Artmed Editora, 2017. p. 353-376.

TALBI, C.; DELGADO, M. J.; GIRARD, L.; RAMIREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E. J. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4587-4591, 2010.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C- content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; NEI, M.; Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ZAHID, M.; ZAFAR, M. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 719-725, 2014.

THOMPSON, C.; CHIMETTO, L.; EDWARDS, R. A.; SWINGS, J.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. L. Microbial genomic taxonomy. **BMC Genomics**. v. 14, p.1, 2013.

TINDALL, B. J., ROSSELLÓ-MORA, R., BUSSE, H. J., LUDWIG, W., KÄMPFER, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes **International Journal of Systematic and Evolutionary**

**Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

TORRES, A. R., CURSINO, L., MURO-ABAD, J. I., GOMES, E. A., ARAÚJO, E. F. D., HUNGRIA, M., & CASSINI, S. T. A. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 852-856, 2009.

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, n. 11, p. 2631-2637, 2006.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; RIVAS, R.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: ZAIDI, A.; KHAN, M.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbes for legume improvement**. Switzerland: Springer, 2017.

VERMA, R.; ANNAPRAGADA, H.; KATIYAR, N.; SHRUTIKA, N.; DAS, K.; MURUGESAN, S. *Rhizobium*. In: AMARESAN, N., KUMAR, M. S., ANNAPURNA, K., KUMAR, K., SANKARANARAYANAN, A. (Eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**. Academic Press, 2020. p. 37-54.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUJIN, F. J.; LUPSKY, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIEIRA, R. F. Diversidade e taxonomia de rizóbio. In: DA SILVEIRA, A. P. D.; DOS SANTOS FREITAS, S. (Eds.) **Microbiota do solo e Qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p. 165-192.

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

WANG, F.; WANG, E. T.; WU, L. J.; SUI, X. H.; LIJr, Y.; CHEN, W. X. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2582-2588, 2011.

WANG, F. Q.; WANG, E. T.; LIU, J.; CHEN, Q.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1192-1199, 2007.

WANG, L.; CAO, Y.; WANG, E. T.; QIAO, Y. J.; JIAO, S.; LIU, Z. S.; WEI, G. H. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 211-219, 2016.

WANG, Y. C.; WANG, F.; HOU, B. C.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X.; YAN, L.; ZHANG, Y. B. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 467-473, 2013.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L.H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463- 464, 1987.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697703, 1991.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

YAN, J.; LI, Y.; HAN, X. Z.; CHEN, W. F.; ZOU, W. X.; XIE, Z.; LI, M. *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 7, p. 1003-1009, 2017a.

YAN, J.; YAN, H.; LIU, L. X.; CHEN, W. F.; ZHANG, X. X.; VERÁSTEGUI-VALDÉS, M. M.; WANG, E. T.; HAN, X. Z. *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 1, p. 97-104, 2017b.

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination 'Sinorhizobium adhaerens' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 2107-2110, 2003.

ZINGA, M. K.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, 2017.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. Antagonistic endophytic bacteria associated with

nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 269-278, 2018.

ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; PEIX, A.; LEÓN-BARRIOS, M.; WILLEMS, A.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VALÁZQUEZ, E.; VAN BERKUM, P. Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2354-2359, 2009.

## APÊNDICES

## Apêndice A

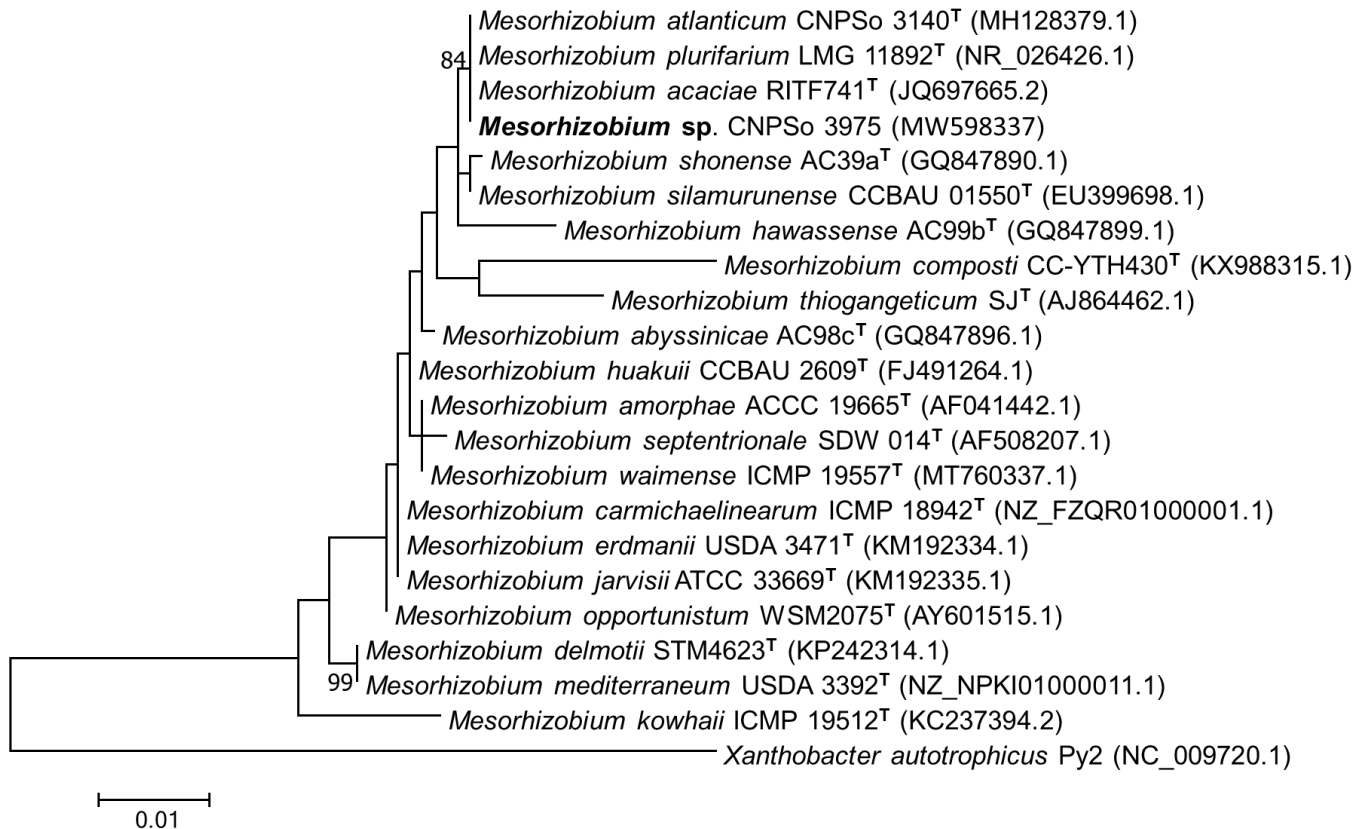
Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rRNA (953 pb) da estirpe *Bradyrhizobium* sp. CNPSo 3435 (em negrito) e espécies do gênero *Bradyrhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com 1000 repetições *bootstrap*). *Xanthobacter autotrophicus* Py2 foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas.



0,01

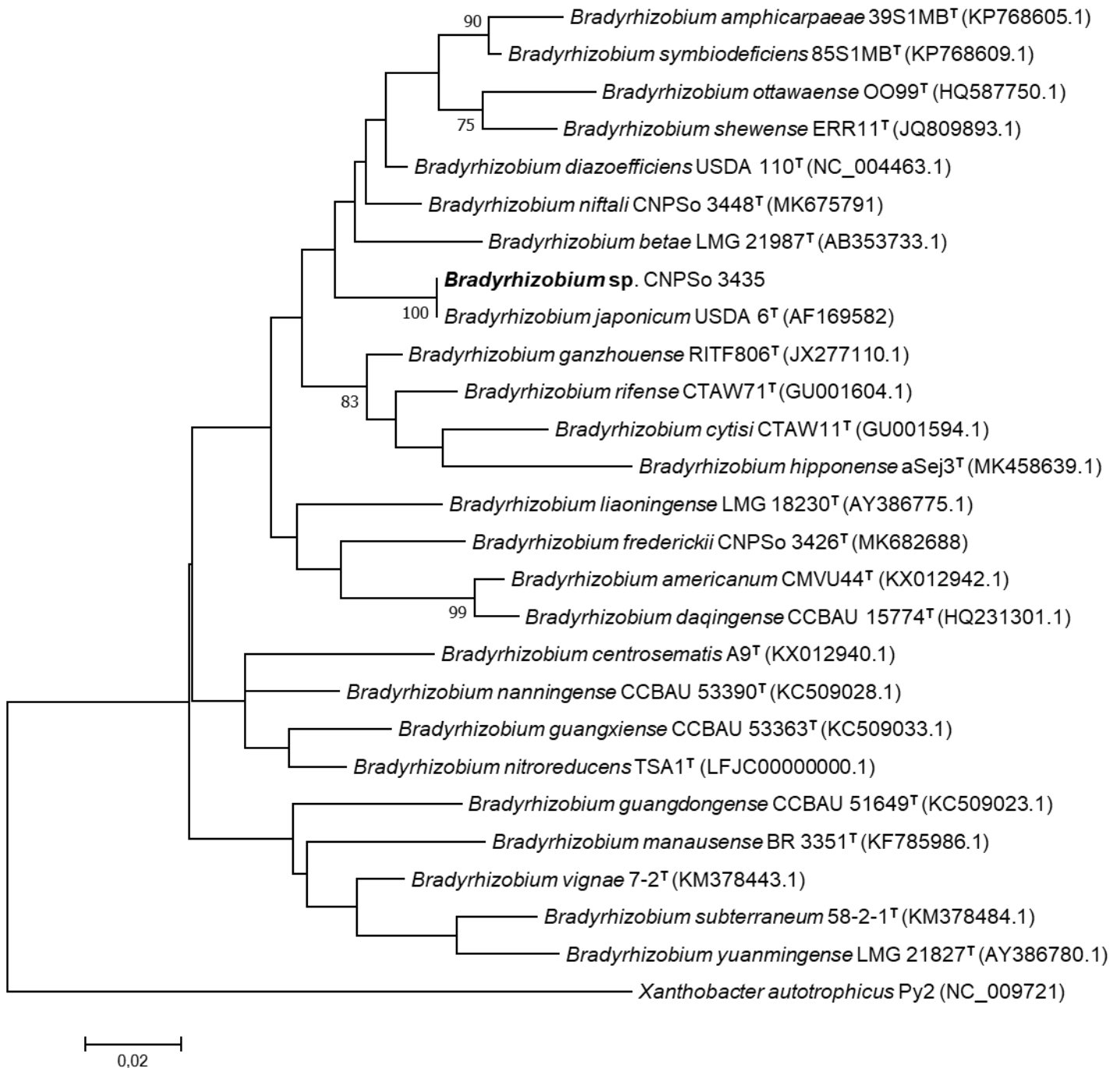
## Apêndice B

Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S RNAr (968 pb) da estirpe *Mesorhizobium* sp. CNPSo 3975 (em negrito) e espécies do gênero *Mesorhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Kimura-2-parâmetros (K2), com distribuição G, com 1000 repetições *bootstrap*). *Xanthobacter autotrophicus* Py2 foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica uma substituição por 100 posições nucleotídicas.



### Apêndice C

Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *housekeeping glnII* (504 pb) da estirpe *Bradyrhizobium* sp. 3435 (em negrito) e espécies do gênero *Bradyrhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-Nei (TN93), com distribuição G, com 1000 repetições *bootstrap*). *Xanthobacter autotrophicus* Py2 foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas.



## Apêndice D

Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *housekeeping glnI* (516 pb) da estirpe *Mesorhizobium* sp. CNPSo 3975 (em negrito) e espécies do gênero *Mesorhizobium* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-3-parâmetros (T92), com distribuição G, com 1000 repetições *bootstrap*) utilizando o *software* Mega 7.0. A estirpe deste estudo está mostrado em negrito. *Xanthobacter autotrophicus* Py2 foi usado como *outgroup*. Valores de *bootstrap* superiores a 70% são apresentados nos nós. Barra de escala indica duas substituições por 100 posições nucleotídicas.

